



A susceptibilidade de vinhos elementares ao crescimento da levedura *Dekkera bruxellensis*

Inês Gomes Forte Madeira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Viticultura e Enologia

Orientador: Professor Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira

Júri:

Presidente: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Licenciada Olga Maria Carrasqueira Laureano, Investigadora Coordenadora do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido à colaboração de muitas pessoas a quem quero prestar o meu mais sincero obrigado:

Ao Professor Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, por me ter aceite como orientanda, pelo optimismo e entusiasmo com que sempre conduziu este trabalho e sobretudo pela boa disposição permanente que facilitou todo este processo.

Ao Professor Doutor Vergílio Borges Loureiro, pela sua sabedoria e palavras de apreço nos momentos de maior aflição.

A todas as pessoas que me cederam amostras que possibilitaram este estudo nomeadamente o Vítor Guimarães, David Ferreira, Catarina Fernandes e especialmente ao Sr. Mário Sérgio produtor na quinta das Bageiras pelo entusiasmo e disponibilidade que mostrou desde o primeiro momento.

À Eng. Ana Carla Silva, pela paciência, disponibilidade e rigor em todos os processos laboratoriais no departamento de Microbiologia.

À D. Maria Júlia Barata pela simpatia e facilidade em muitos dos processos essenciais a este trabalho.

Ao Dr. André Barata pelo ensinamento em toda a parte prática deste trabalho e pela disponibilidade mesmo quando o tempo também lhe faltava.

À D. Manuela e D. Helena pela boa disposição permanente, pela motivação e por toda a disponibilidade que sempre demonstraram.

Ao Mahesh, por toda a ajuda na parte experimental deste trabalho e pelas palavras de incentivo.

À Mara Pereira, pelo ânimo e incentivo, mas sobretudo pela amizade.

A todos os meus amigos que conheci na faculdade mas que passaram a fazer parte da minha rede de amizades, Catarina Fernandes, Catarina Dias, Ana Cadete, Maria Pedro, Cátia.

Ao meus amigos de sempre, pela presença e pelas palavras certas na altura exacta, especialmente à Sara e ao Rodrigo pelo exemplo e pelo resto.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, à minha avó (que viu começar esta aventura mas que infelizmente não a viu terminada) pela dedicação, coragem, boa disposição e toda a estrutura necessária para que aconteça este fenómeno que é a vida.

À minha irmã Ana Madeira por ser a grande companheira que tenho a sorte de ter na vida.

Resumo

O objectivo do presente trabalho foi perceber a diferente susceptibilidade de vários vinhos tintos ao crescimento e produção de fenóis voláteis pela levedura *Dekkera bruxellensis* ISA 1791.

Em primeiro lugar foi avaliado o efeito da concentração de taninos no crescimento, onde se observou uma perda de viabilidade acrescida com o aumento da sua concentração, sem no entanto conduzir a morte celular completa.

Para avaliar a resposta do crescimento e produção de 4-etilfenol em vinhos de castas elementares foram usados vinhos tintos (Touriga Nacional, Syrah, Cabernet Sauvignon e Baga) de regiões diferentes (Alentejo, Ribatejo e Bairrada). No caso dos vinhos elementares não se registou crescimento nem produção de 4-etilfenol devido a morte celular total em menos de 24 horas. No entanto, quando foram acertados os valores de etanol (12% v/v), pH (3,50), acidez total (7 g/l), taninos (IPT 80) e na ausência de sulfuroso livre, registou-se um aumento no crescimento celular em todas as amostras. Observou-se uma produção de 4-etilfenol como resposta a esse crescimento celular, com rendimentos que variaram entre 140 µg/log CFU na casta Baga e 978 µg/log CFU na Syrah do Alentejo.

PALAVRAS-CHAVE: *Dekkera/Brettanomyces*, Leveduras de alteração, Vinhos, Fenóis Voláteis, HPLC.

Abstract

The goal of this work was to understand the diverse susceptibility of several red wines to the increase and production of phenols by yeast *Dekkera bruxellensis* ISA 1791.

In first place was to evaluate the concentration effect of tannins on the growth, observing a lost of viability increased with enlargement of you concentration, without, however lead to complete cell death.

To evaluate the answer of growth and production of 4-etylphenol in wines of elementary grape varieties were used red wines (Touriga Nacional, Syrah, Cabernet Sauvignon and Baga) from different regions (Alentejo, Ribatejo, Bairrada). In case of elementary wines, did not verified growth nor production of 4-etylphenol because of the cell death in less than 24 hours. However, when the values of ethanol were corrected (12%v/v), pH (3.50), total acidity (7 g/l), tannins (IPT 80) and in the absence of free sulphur dioxide was registered an increase of cellular growth as a reply to that same cellular growth in all samples. It was observed one production of 4-etylphenol as reply to that same cellular growth, with income which vary between 140 µg/log CFU in Baga variety and 978 µg/log CFU in Syrah variety in Alentejo.

KEYWORD: *Dekkera/Brettanomyces*, Spoilage yeast, Wines, Volatile Phenols, HPLC.

Extended Abstract

The yeasts of *Dekkera* are a great concern for modern oenology since when presented in wines, produce substantial amounts of volatile phenols, namely 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol, compounds that lead to emergence of aromatic descriptors from gender "phenolic", "animal", "horse sweat" and "stable", which depreciate dramatically the aromatic quality of wines.

Empirically there is the idea that exists grape varieties more susceptible than others to contamination by this yeasts. Therefore, in this work, we studied factors that influence the susceptibility from wines to growth and production of volatile phenols by *D. bruxellensis*, using wines with elementary varieties obtained in different regions of Portugal. For this trials was used wines from four different grape varieties (Touriga Nacional, Syrah, Cabernet Sauvignon and Baga) from three different regions (Alentejo, Ribatejo and Bairrada). Alongside this we followed the yeasts behaviour with different tannin concentration and evaluate its viability.

We verified that bigger concentrations of tannin in the wine lead to a lost of viability but without register complete cell dead. In all cases was observed the cellular recovery suggesting that this might be a factor where the interaction with others more aggressive may influence negatively the viability of yeast *Dekkera* gender.

Regarding the evaluation of growth of *D. bruxellensis* ISA 1791 in samples of wine in the same conditions as are produced, did not registered any growth what suggests that yeast used was not adapted to growth in this wines. In the comparison between the susceptibilities of different grape varieties to the growth, the inoculated wines had equivalent analytical parameters, namely in what concerns to pH, total acidity, content alcohol, tannins concentration in the total absence of free sulphur dioxide. In this case, observed that the samples of Cabernet Sauvignon Alentejo was where were found a significant cellular growth, result of greater sugar concentrations. However, were the samples of Syrah variety that registered the biggest reaction of volatile phenols development (glucose and fructose) not in this case the limiting factor, being the cinnamic acids concentration a factor very decisive in the volatile phenols concentration.

KEYWORD: *Dekkera/Brettanomyces*, Spoilage yeast, Wines, Volatile phenols, HPLC.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Conceito de susceptibilidade ao ataque microbiano em vinhos.....	1
1.2. Conceito de microrganismo de alteração	2
1.3. Importância das leveduras do género <i>Dekkera</i> em enologia	3
1.4. Caracterização do género <i>Dekkera</i>	4
1.4.1. Espécies existentes	4
1.4.2. Características gerais	5
1.4.3. Actividade de alteração	7
1.4.4. Produção de fenóis voláteis por <i>Dekkera</i> spp e o seu impacto organoléptico em vinhos.....	8
1.4.5. Factores que afectam o crescimento e a produção de fenóis voláteis	13
1.4.5.1. Disponibilidade de O ₂	13
1.4.5.2. Temperatura	14
1.4.5.3. Teor Alcoólico	14
1.4.5.4. Efeito dos Precusores	15
1.4.5.5. Teor de açúcares	16
1.4.5.6. Efeito dos conservantes	17
1.5. Enquadramento e objectivos do trabalho	19
2. Material e Métodos	20
2.1. Vinhos Analisados	20
2.2. Identificação e caracterização do meio de cultura	21
2.2.1. Estirpe utilizada e preparação do pré-inóculo	21
2.2.2. Preparação do inóculo	21
2.3. Preparação dos vinhos	21
2.3.1. Análises químicas.....	22
2.3.2. Acertos dos parâmetros.....	22
2.3.3. Inoculação	23
2.4. Estudo da viabilidade de <i>Dekkera bruxellensis</i>	23
2.4.1. Efeito de diferentes concentrações de taninos no crescimento da levedura <i>D. bruxellensis</i>	23
2.4.2. Crescimento da levedura <i>D. bruxellensis</i> em vinhos elementares	24

2.4.2.1. Contagem das Células viáveis	24
2.4.2.2. Extracção de 4-etilfenol.....	24
2.4.3. Crescimento em vinhos com parâmetros analíticos equivalentes	25
2.4.3.1. Contagem das células viáveis e extracção de 4-etilfenol.....	26
2.4.3.2. Análise por HPLC (Cromatografia líquida de alta performance)	26
3. Resultados e Discussão	28
3.1. Análises químicas das amostras.....	28
3.2. Estudo da viabilidade de <i>Dekkera bruxellensis</i>	30
3.2.1. Efeito do teor de taninos.....	30
3.2.2. Crescimento e produção de 4-etilfenol em vinhos elementares	31
3.2.3. Crescimento em vinhos com parâmetros analíticos equivalentes	33
3.2.3.1 Produção de 4-etilfenol	36
3.2.3.2 Rendimentos da produção de 4-etilfenol	39
4. Conclusões e perspectivas futuras	41
5. Bibliografia	43
Anexos	48
Anexo I – Curva de calibração para a determinação da concentração de 4-etilfenol por cromatografia gasosa.....	49
Anexo II – Relação entre a quantidade de taninos adicionada e o índice de polifenóis totais (IPT)	500
Anexo III – Evolução das concentrações dos compostos: ácido tartárico, glucose, ácido galacturónico, frutose, ácido succínico, ácido láctico, glicerol, ácido acético e etanol por análise de HPLC	511
Anexo IV – Curvas de calibração do HPLC para determinação das concentrações dos compostos: ácido tartárico, glucose, ácido galacturónico, frutose, arabinose, ácido sucínico, aácido láctico, glicerol, ácido acético e etanol.	522

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Descritores sensoriais dos fenóis voláteis dos vinhos e sua conotação.....	11
Tabela 1.2 – Limiares de Percepção, recuperação e preferência ($\mu\text{g/l}$) de vários fenóis voláteis nos vinhos.....	12
Tabela 2.1 – Caracterização das Amostras	20
Tabela 3.1 – Análises químicas do vinho usado na experiência de avaliação da influência dos taninos no crescimento	28
Tabela 3.2 – Análises químicas das amostras de vinho	29
Tabela 3.3 – Análises químicas do vinho no final do acerto dos parâmetros	29
Tabela 3.4 – Viabilidade (UFC/mL) de <i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 1791 ao longo do período de incubação (horas)	32
Tabela 3.5 – Concentração de 4-etilfenol (ppb) produzido por <i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 1791 em amostras em cinco tempos diferentes	33
Tabela 3.6 – Concentração dos compostos pelo método HPLC das amostras Touriga Nacional	35
Tabela 3.7 – Rendimento de produção de 4-etilfenol das amostras	40

Índice de figuras

1.1 – Factores que afectam a estabilidade do vinho	2
1.2 – Cronologia de identificação das leveduras dos géneros <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	5
1.3 – Colónias de <i>Dekkera bruxellensis</i> com cinco dias de crescimento	6
1.4 – Reacção de biossíntese de etilfenóis por <i>Dekkera</i> spp.	9
3.1 – Crescimento da estirpe <i>D. bruxellensis</i> ISA 1791 em vinho na concentração inicial 10^4 células/mL como resposta a diferentes concentrações de tanino	31
3.2 – Crescimento da estirpe <i>D. bruxellensis</i> ISA 1791 com concentração inicial de 10^4 células/mL	34
3.3 – Crescimento e produção de 4-etilfenol da estirpe <i>D. bruxellensis</i> ISA 1791 na concentração inicial de 10^4 células/mL em vinho da casta Touriga Nacional	36
3.4 - Crescimento e produção de 4-etilfenol da estirpe <i>D. bruxellensis</i> ISA 1791 na concentração inicial de 10^4 células/mL em vinho da casta Syrah	37
3.5 - Crescimento e produção de 4-etilfenol da estirpe <i>D. bruxellensis</i> ISA 1791 na concentração inicial de 10^4 células/mL em vinho da casta Cabernet Sauvignon	38
3.6 - Crescimento e produção de 4-etilfenol da estirpe <i>D. bruxellensis</i> ISA 1791 na concentração inicial de 10^4 células/mL em vinho da casta Baga	39

Lista de abreviaturas

YNB – Yeast nitrogen base

GYP – Glucose yeast peptone

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

IPT – Índice de polifenóis totais

UFC – Unidades formadoras de colónias

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

GC – Cromatografia gasosa

RPM – Rotações por minuto

TN_A – Touriga Nacional Alentejo

TN_R – Touriga Nacional Ribatejo

S_A – Syrah Alentejo

S_R – Syrah Ribatejo

CS_A – Cabernet Sauvignon Alentejo

CS_R – Cabernet Sauvignon Ribatejo

B – Baga

1. Introdução

1.1. Conceito de susceptibilidade ao ataque microbiano em vinhos

Na indústria alimentar uma das maiores preocupações é garantir a estabilidade dos produtos, não só no que diz respeito ao equilíbrio microbiológico como a todo o processo de transformação desde a matéria-prima até ao produto final (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Na indústria vínica, o objectivo dos enólogos é assegurar que a actividade microbiana contaminante não afecta o produto final e garantir a sua estabilidade ao longo do tempo (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Em enologia, a susceptibilidade de contaminação é afectada por uma série de factores, começando no estado sanitário da matéria-prima (Figura 1.1). O grau de maturação e a composição química das uvas determina o tipo e o nível de interacções microbiológicas. No entanto, as boas práticas de higiene em todos os processos de vinificação bem como na estabilização e engarrafamento, é determinante na estabilidade dos vinhos produzidos.

Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003) sugerem que o conceito de susceptibilidade pode ser estudado pré-estabelecendo condições experimentais de resistência de um vinho a um agente de alteração conhecido. Segundo os mesmos, a escolha das espécies com diferentes capacidades de alteração permitiria obter uma série de resultados para classificar o conceito de susceptibilidade. Muitos foram os autores que estudaram este tema propondo várias hipóteses. Thomas (1983), num trabalho experimental, inoculou 80 estirpes conhecidas em vinhos e obteve uma relação entre os microrganismos usados e a sua capacidade de alteração. No entanto, nada concluiu sobre a susceptibilidade dos vinhos com a sua composição química. Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003) sugerem um modelo que relaciona a susceptibilidade a alguns agentes de alteração com o álcool e o teor de açúcar residual. No entanto, tendo em conta o seu carácter redutor, tentaram-se modelos matemáticos que relacionassem a susceptibilidade do vinho com o seu teor alcoólico, pH, oxigénio e níveis de conservantes (Loureiro e Malfeito 2003). Este esforço verificou-se infrutífero uma vez que a susceptibilidade de um vinho à contaminação tem contornos bastante diferentes mesmo para vinhos em condições químicas semelhantes.

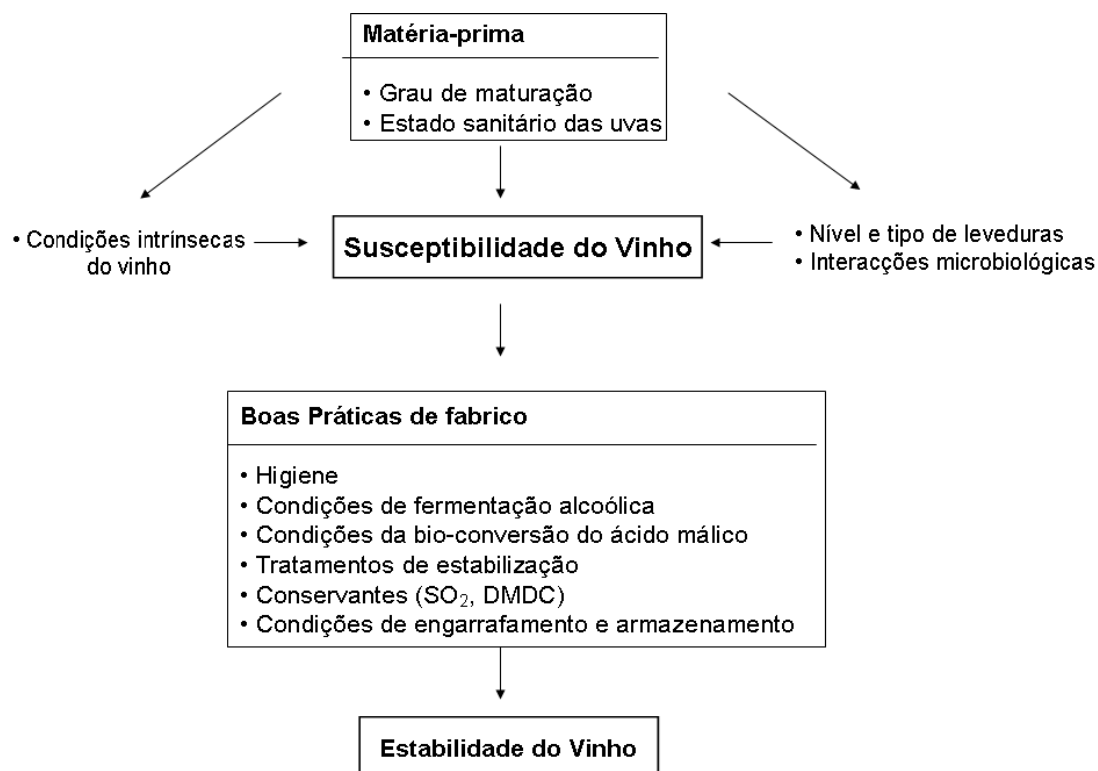


Figura 1.1. Factores que afectam a estabilidade do vinho (adaptado de Loureiro e Malfeito- Ferreira, 2003)

1.2. Conceito de microrganismo de alteração

Os microrganismos de alteração são um problema sério na indústria alimentar pois têm a capacidade de tornar um produto impróprio, para consumo humano, causando nalguns casos perdas económicas enormes (Loureiro, 2000). Apesar da dificuldade em definir este conceito, considera-se que apenas têm esta designação, os que produzem quantidades suficientes de um composto capaz de modificar as características sensoriais do produto final, quando transformado de acordo com o manual de boas práticas (Pitt and Hocking, 1985 *cit in* Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Quando isso não acontece, considera-se que esses compostos apenas contribuem para complexidade do produto (Fleet, 1992). Contudo, a definição de microrganismos de alteração torna-se mais complexa no caso dos produtos com capacidades fermentescíveis. Neste processo participam inúmeras espécies de microrganismos (leveduras e bactérias) capazes de modificar as características sensoriais do produto (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003), tornando-se difícil

separar as actividades fermentativas benéficas e essenciais dos mecanismos de alteração (Fleet, 1992).

A contaminação é o resultado da actividade microbiana e na indústria vínica essa alteração deve-se principalmente a bactérias lácticas, acéticas e leveduras (Sponholz, 1992). Destes microrganismos, as leveduras são as mais resistentes a condições extremas. Há vestígios deste microrganismo em produtos com pH baixos e concentrações consideráveis de conservantes, ambientes onde as bactérias não se conseguem desenvolver (Deak e Beuchat, 1996 *cit in* Loureiro, 2000). Com o objectivo de melhorar a qualidade dos alimentos, a sugestão é diminuir as quantidades de conservantes aplicadas nos produtos, causando por outro lado o aumento da contaminação por parte das leveduras (Fleet, 1992). A actividade descontrolada dos microrganismos de alteração em qualquer momento do processo de vinificação, pode alterar a composição química dos vinhos e prejudicar as suas propriedades sensoriais (Du Toit *et al.*, 2005). Os principais efeitos destes microrganismos são a formação de filmes nos vinhos engarrafados, turvação, produção de gás e formação de produtos secundários capazes de alterar o aroma e o sabor dos vinhos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

1.3. Importância das leveduras do género *Dekkera* em enologia

As leveduras de alteração podem ser subdivididas em dois grupos, as de *sensu lato* e as de *sensu stricto* (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). O primeiro grupo engloba as espécies capazes de alterar as características organolépticas do vinho, independentemente de apresentarem ou não resistência aos processos de conservação e estabilização usados nesta indústria. As deteriorantes em *sensu lato* são as leveduras capazes de deterioração de vinhos quando produzidos de acordo com o código das boas práticas enológicas.

No que respeita à indústria vínica o interesse pelas leveduras de alteração tem aumentado bastante. De todas as leveduras capazes de provocarem alterações nos vinhos, a que tem suscitado maiores problemas, em termos práticos, são as do género *Dekkera/Brettanomyces* (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Este grande interesse deve-se ao facto da sua capacidade de produzir compostos secundários (ácido acético, tetrahidropiridinas e fenóis voláteis) altamente prejudiciais (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006, Suárez *et al.* 2007). Contudo, a presença desta levedura em vinhos tem suscitado algumas discordâncias entre os enólogos. Se por um lado a sua presença está associada a uma conotação negativa, foi reconhecido que alguns vinhos possuíam o chamado “carácter

Brett". A presença desta característica pode ser negativa ou positiva, conforme as suas concentrações e o estilo de cada vinho (Wedral *et al.*, 2010). Contudo, se a produção destes compostos, em pequenas quantidades, pode contribuir para a complexidade aromática, a verdade é que ultrapassando certos limites, marca-os negativamente, impedindo a obtenção de vinhos de alta qualidade, conduzindo diversas vezes à sua depreciação (Barata, 2002).

1.4. Caracterização do género *Dekkera*

1.4.1. Espécies existentes

A primeira referência a *Brettanomyces* foi feita em 1904 por Claussen isolando-a em cerveja – New Carlsberg Brewery (Henschke *et al.*, 2007). Neste caso, o efeito parecia ser positivo concedendo especificidade à cerveja (Spaepen 1978 *cit in* Rodrigues 1998). Mais tarde, Claussen examinou as culturas de *Brettanomyces* no sentido de as classificar (Smith *et al.*, 1990) e referenciou a sua presença pela primeira vez em vinhos, onde descreve quatro espécies deste género (*B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. clausenii*) (Van der Walt e Van Kerken 1958 *cit in* Silva 1998). Mais tarde, Schanderel descreve as leveduras deste género como causadoras de turvações e alterações na acidez volátil (Gilland, 1961). Posteriormente encontraram-se ascósporos em algumas espécies já descritas, altura em que o género *Brettanomyces* foi considerado como género imperfeito e assexuado (anamorfo) surgindo um novo género perfeito (teleomorfo) designado como *Dekkera* (Van der Walt e Van Kerken 1960 *cit in* Silva 1998). Ao longo do tempo, muitas foram as alterações feitas nas espécies destes dois géneros (figura 1.2). Actualmente são consideradas cinco espécies de *Brettanomyces* (*B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus*) e duas espécies do género *Dekkera* (*D. anómala*, *D. bruxellensis*). As espécies pertencentes a cada género caracterizam-se e distinguem-se entre si pelo seu comportamento face à fermentação assim como a assimilação das diferentes fontes de carbono.

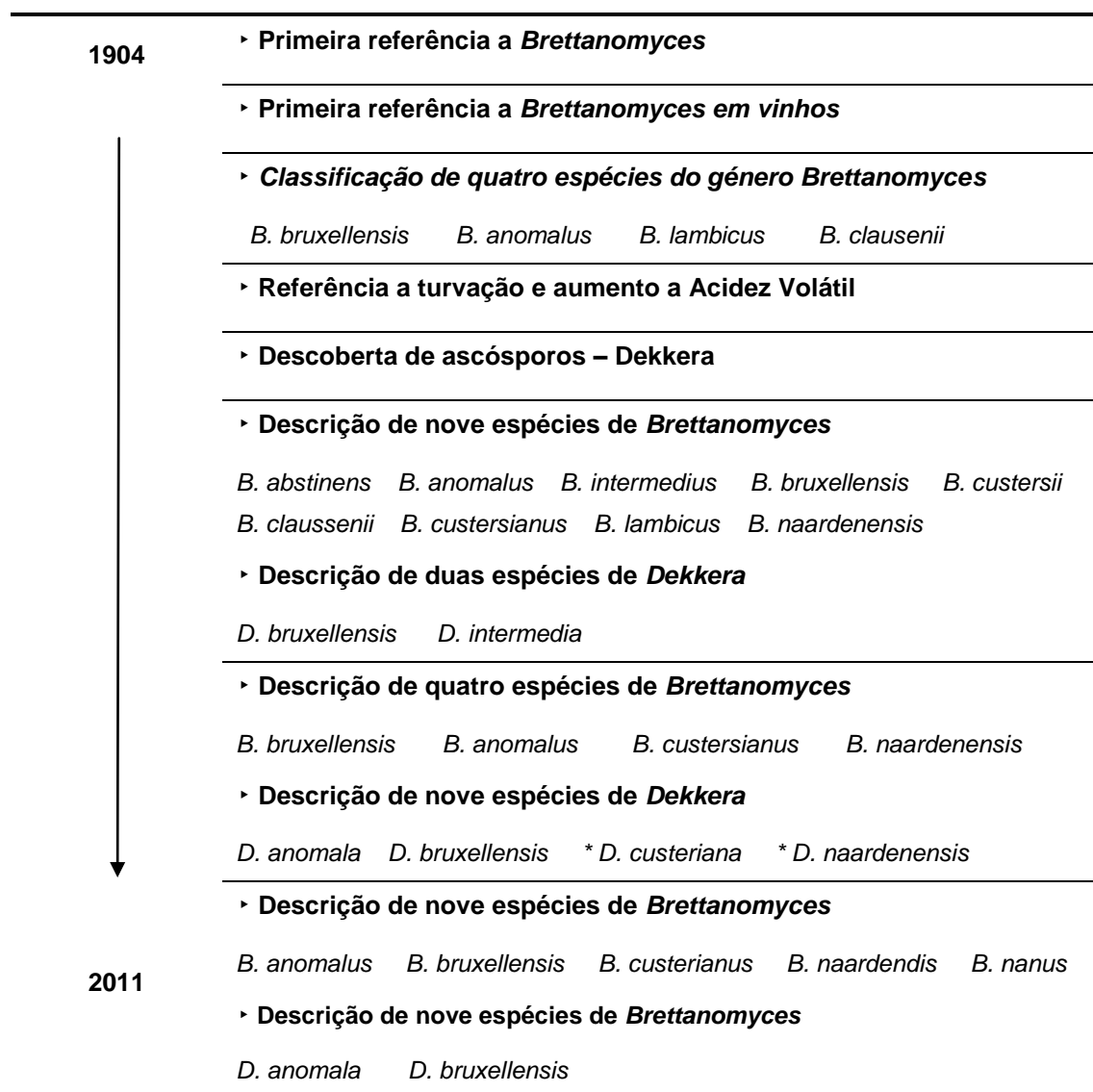


Figura 1.2. Cronologia de identificação das leveduras dos géneros *Dekkera/Brettanomyces*.

1.4.2. Características gerais

A levedura dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* são descritas na literatura como parte integrante da microbiota de muitos produtos fermentados (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006, Suárez, 2007). São leveduras bastante diferentes das responsáveis pela fermentação do mosto de uva (Barata, 2002), apresentando, uma actividade fermentativa bastante fraca (Sponholz, 1992). Podem no entanto atingir os 9 a 12 % (v/v) de etanol e em presença de

glucose produzem elevadas quantidades de ácido acético e alguns compostos secundários responsáveis pela alteração das características organolépticas (Sponholz, 1992).

Apresenta-se em colónias de coloração branca ou bege de forma ogival, elíptica, afiada nas pontas ou alongada e ramificada (Kurtzman e Fell, 1998). Têm uma forma heterogénea devido ao tipo de reprodução por gemulação unipolar (Barnett et al., 1990). Segundo os mesmos autores, podem formar pseudo-hifas e/ou hifas septadas, ascas evanescentes contendo de um a quatro ascósporos em forma de chapéu.



Figura 1.3. Colónias de *Dekkera bruxellensis* com cinco dias de crescimento.

Estas leveduras são auxotróficas crescendo na total ausência de vitaminas, mas apresentando nestes casos uma multiplicação muito lenta (Peynaud e Domerq, 1956 *cit in* Gonçalves, 1996). As vitaminas essenciais ao seu crescimento são biotina e tiamina (Van der Walt e Van der Kerken, 1960 *cit in* Silva 1998). No entanto, alguns autores referem que a tiamina é a mais importante das duas, permitindo um maior crescimento populacional, favorecendo o consumo de açúcares (Dias *et al.*, 2003).

As leveduras *Dekkera bruxellensis* assim como o seu anamorfo *Brettanomyces bruxellensis* são muito comuns em vinhos e podem ser encontradas na película do bago assim como nos barris durante o envelhecimento (Wedral, *et al.*, 2010), ou mesmo durante o seu engarrafamento (Froudiere e Larue, 1988). Pelo contrário, Fugelsang (1993) sugere que não se esperam leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* nas uvas, defende, antes, que estes microrganismos se propagam pela adega com origem no vinho já infectado, causado pela falta de higiene nos equipamentos ou mesmo pela mosca da fruta (*drosophila*). Estas leveduras podem estar presentes em todos os momentos do processo de vinificação mas pode permanecer num estado onde são viáveis mas não cultiváveis ou num estado de dormência por longos períodos de tempo. São consideradas, nestes casos, células sem capacidade de crescimento mas com potencial capacidade de recuperação (Arvik e Henick-Kling, 2002 *cit in* Wedral, *et al.*, 2010). Ainda assim, este género de leveduras tem capacidade de produção de compostos secundários mesmo em baixa densidade, fazendo com que a sua detecção seja muito difícil devido ao crescimento lento que apresenta (Wedral, *et al.*, 2010). Segundo o mesmo autor os compostos voláteis produzidos podem estar presentes mesmo quando os microrganismos são indetectáveis ou minimamente detectáveis. Coulon *et al.*, (2009) referem que populações cultiváveis parecem ser capazes de sintetizar maiores quantidades de fenóis voláteis que as células viáveis mas não cultiváveis.

As leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* podem ser detectadas directamente utilizando técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) ou indirectamente, combinando métodos clássicos de cultura biológica com outros métodos como a cromatografia gasosa (GC) ou análise sensorial (Suaréz, 2007).

1.4.3. Actividade de alteração

Sponholz (1992) refere que as leveduras do género *Brettanomyces* são das leveduras de alteração mais perigosas. Além de terem a capacidade de turvação do vinho e do aumento da acidez volátil (Gilliland, 1961), estas leveduras provocam alterações sensoriais. Os termos utilizados para descrever estas alterações são: cravinho, especiaria, suor a cavalo, couro e fumo (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Estas alterações sensoriais devem-se essencialmente á acção de enzimas (esterases) e de compostos formados

durante o desenvolvimento de *Dekkera/Brettanomyces*: ácido acético, tetrahidropiridinas e fenóis voláteis (Barata, 2002).

As espécies deste género são fortemente acidogénicas, capazes de provocar vinhos com valores de acidez volátil até 700% superior à *Saccharomyces cerevisiae* (Larue, *et al.*, 1991). Miniac (1989), em estudos de fermentações, descobriu que as leveduras do género *Brettanomyces* eram as responsáveis pelos amos de fermentação. Mais tarde verificou-se que numa primeira fase do crescimento a levedura fermenta a glucose existente no meio originando quantidades iguais de etanol e ácido acético. Quando toda a glucose do meio é consumida, o crescimento dá-se pelo consumo de etanol convertido em ácido acético. Depois de uma fase de latência, o crescimento é activado novamente com o consumo de ácido acético oxidado a dióxido de carbono (Wijsman *et al.*, 1984). Outra das particularidades desta levedura é a capacidade de influenciar negativamente os vinhos pela produção de aromas descritos como “cheiro a rato” (Barata, 2002). Este é um problema causado pela formação de compostos tetrahidropiridinas e ocorre apenas em vinhos com baixa acidez. Contudo não se deve exclusivamente ao metabolismo das leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* (Barata, 2002).

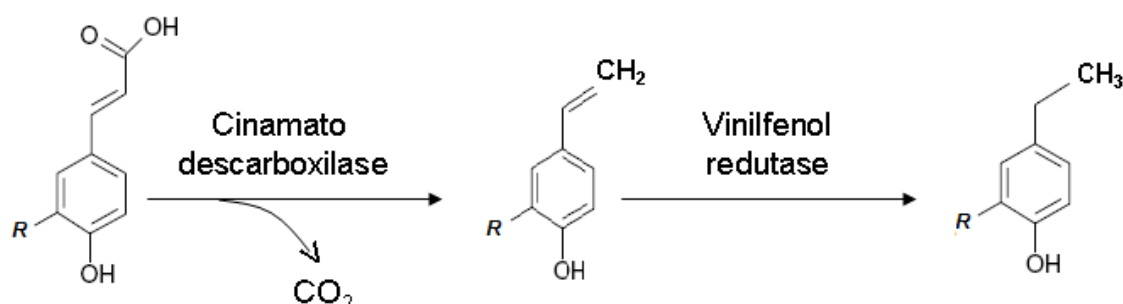
Este género de leveduras são consideradas como as leveduras de contaminação mais importantes na indústria vínica, capaz de produzir elevadas quantidades de fenóis voláteis e consequentemente originar alterações organolépticas graves (Martorell *et al.*, 2006). Estas alterações dos vinhos estão associadas a aromas descritos como suor a cavalo, estrebaria, couro, animal, fenólico (Barata, 2002).

1.4.4. Produção de fenóis voláteis por *Dekkera* spp e o seu impacto organoléptico em vinhos

Enquanto os vinhos tintos se caracterizam por possuírem concentrações, por vezes elevadas, em etilfenóis (4-etilfenol e 4-etilguaicol), os vinhos brancos são praticamente desprovidos destes compostos, apresentando concentrações mais ou menos importantes de vinilfenóis (4-vinilguaiacol e 4-vinilfenol) (Gonçalves 1996). Os etilfenóis em vinhos tintos, podem ter várias origens. Apesar de estarem fortemente presentes em madeira de carvalho (*Quercus* sp.) utilizada para as barricas de envelhecimento, esta não explica as elevadas concentrações nos vinhos (Barata, 2002). De facto, a origem dos fenóis voláteis ficou

esclarecida, quando em 1990 se concluiu que se tratavam de compostos de origem desconhecida (Barata 2002).

A produção de fenóis voláteis foi estudada durante o ciclo crescimento de *Dekkera*, ao analisar a biossíntese dos etilfenóis. Nesta reacção concluiu-se que durante a fase de latência (0 a 24 h) se assistia essencialmente a uma síntese de 4-vinilfenol com o ácido *p*-cumárico como substrato. Do fim desta fase até ao fim da fase exponencial (24 h a 72h) observava-se um forte aumento na síntese de 4-etilfenol, enquanto diminuía o 4-vinilfenol (Chatonnet *et al.*, 1995). Com base nestes resultados, concluiu-se que havia uma acção sequencial de duas enzimas num ácido hidroxicinâmico que funciona como substrato na formação de fenóis voláteis (Suárez *et al.*, 2007). Numa primeira fase, o ácido hidroxicinâmico (ácido ferúlico, cumárico ou cafeico) é descarboxilado pela enzima hidroxicinamato descarboxilase transformando-se num hidroxi-estireno (figura 1.4). Depois desta etapa, a enzima vinilfenol redutase é induzida reduzindo o 4-vinilfenol e o 4-vinilguaiaicol a 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol, respectivamente.



Ácido Cinâmico	R	Fenóis Voláteis	Fenóis Voláteis Forma reduzida
p-Cumárico	H	4-vinilfenol	4-etilfenol
Ferrúlico	OCH ₃	4-vinilguaiaicol	4-etilguaiaicol
Cafeico	OH	4-vinilcatecol	4-etilcatecol

Figura 1.4. Reacção de biossíntese de etilfenóis por *Dekkera* spp. (adaptado de Suárez *et al.* 2007).

Coulon *et al.* (2009) estudaram a problemática da síntese dos fenóis voláteis. Questionaram-se se é o estado das células que influencia a capacidade de produção de fenóis voláteis ou se é a síntese dos mesmos que confere melhores condições de crescimento das células. Observaram que a máxima concentração de vinilfenol coincide com uma multiplicação acelerada das células, que decrescem de seguida. Este facto sugere que o seu metabolismo seja centrado na produção final de etilfenol, fenómeno que é geralmente, acompanhado com uma diminuição da população e/ou uma mudança de estado para não-cultivável. De facto, Romano *et al.*, (2008), referem que em vinhos, a produção de etilfenóis ocorre durante o fim da fase exponencial ou na fase estacionária de crescimento.

O processo de descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos com a produção de 4-vilfenol e 4-vinilguaicol foi atribuído a leveduras (Steinke e Paulson, 1964 *cit in* Barata, 2002). Contudo referia-se que o 4-etilfenol e o 4-etilguaicol teriam origem bacteriana, durante a fermentação malolática. Chatonnet *et al.* (1995) levaram a cabo estudos sobre a capacidade das bactérias lácticas produzirem fenóis voláteis. Concluiu-se que embora *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus* originassem grandes quantidades de vinilfenóis apenas produziam quantidades vestigiais de etilfenóis, em condições enológicas (Suárez *et al.*, 2007). Estudos comparativos sobre as concentrações de fenóis voláteis produzidos por bactérias lácticas e leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* concluíram que estas últimas produziam cerca de 4 mg/l de 4-etilfenol, enquanto que as bactérias lácticas apenas eram responsáveis por cerca de 0,23 mg/l (Barata 2002). Leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* contêm a actividade de descarboxilação – cinamato descarboxilase e por isso possuem a capacidade de produzir 4-vinilfenol, no entanto não o conseguem reduzir a 4-etilfenol (Dias 2003). Por este motivo, ainda que a enzima que permite a descarboxilação esteja presente num grande número de bactérias, fungos e leveduras, a redução do composto é conseguida apenas por um número reduzido de espécies, entre eles *D. bruxellensis* (Chatonnet, *et al.*, 1995). Os mesmos autores sublinham que no caso de *D. bruxellensis* as enzimas cinamato descarboxilase e a vinilredutase, em condições enológicas, são as responsáveis pelos aromas negativos no vinho.

Joseph e Bison (2004) referem que diferentes espécies de *Dekkera/Brettanomyces* são capazes de produzir diferentes quantidades de etilfenóis. A baixas concentrações o 4-etilfenol pode ser confundido com certas nuances aromáticas naturais dos vinhos, justificando que se considere a presença desta molécula como uma factor positivo (Barata, 2002). No entanto, é considerado que o aumento dessa complexidade depende sempre da finura, do frutado e da tipicidade varietal (Chatonnet *et al.*, 1990 *cit in* Wedral *et al.*, 2010).

Chatonnet *et al.* (1995) elaboraram descritores sensoriais para os compostos fenólicos estudados (tabela 1.1).

Tabela 1.1. Descritores sensoriais dos fenóis voláteis dos vinhos e sua conotação (adaptação de Chatonnet, 1995)

Fenol volátil	Descritor sensorial	Conotação
4-etilfenol	fenólico ☹ ☹ ☹	-
	animal ☹ ☹	-
	estrebaria ☹ ☹ ☹ ☹	-
4-etilguaiaicol	madeira ☹ ☹	+
	especiaria ☹ ☹	+
	fenólico ☹ ☹ ☹	-
	animal ☹ ☹ ☹	-
	fumado ☹ ☹	+/-
4-vinilfenol	fenólico ☹ ☹ ☹	-
	aguado ☹	-
	pesado ☹	-
	couve ☹ ☹ ☹	-
4-vinilguaiaicol	fenólico ☹ ☹ ☹	-
	especiaria ☹ ☹	+
	cravinho ☹ ☹ ☹	+/-
	floral ☹	+

☹ : grau de intensidade

⊕ : conotação positiva

- : conotação negativa

Chatonnet (1992) definiu o limite de detecção como a concentração acima da qual o composto é detectado por 50% dos provadores. Quando o fazem numa solução modelo (solução hidroalcoólica com uma composição semelhante à do vinho) chamam-lhe limite de percepção, quando o fazem em vinho designa-se por limite de recuperação. O valor deste limite é meramente indicativo já que representa a concentração à qual o composto é detectado no aroma global do vinho, que por si só apresenta uma grande complexidade (Gonçalves 1996). Os mesmos autores fazem ainda referência ao limite de preferência e definem-no como a concentração acima da qual o composto imprime defeito ao vinho, sendo rejeitado por 50% dos provadores. Na tabela 1.2 estão apresentados os resultados de um estudo feito por Chatonnet *et al.*, (1992) que relaciona os limites acima descritos para os

vários compostos nos vinhos. Os autores estudaram a mistura de vinilfenóis, na proporção de (1:1) e no caso dos etilfenóis na proporção de (1:10), por ser a relação mais comum encontrada no vinho. Contudo, muitos autores referem que a relação 4-etilguaicol/4-etilfenol, em vinhos tintos, é de 1:8 (Rodrigues *et al* , 2001). No caso dos vinhos brancos, a relação entre 4-vinilfenol/4-vinilguaicol é de 1:1, no entanto há vinhos em que essa relação ascende a 3:1 (Chatonnet, 1995) sem explicação aparente.

Tabela 1.2. Limiares de percepção, recuperação e preferência (µg/l) de vários fenóis voláteis nos vinhos (adaptado de Chatonnet 1995).

Molécula	Limite de Percepção	Limite de Recuperação		Limite de Preferência	
		vinho branco	vinho tinto	vinho branco	vinho tinto
4-vinilguaicol	130	440	380	570	-
4-vinilfenol	180	770	1500	-	-
4-vinilguaicol/ 4-vinilfenol (1:1)	-	390	-	350/375	-
4-etilguaicol	47	70	150	-	140
4-etilfenol	440	600	605	-	620
4-etilguaicol/ 4-etilfenol (1:10)	-	-	41/328	-	46/380

De acordo com os resultados, podemos concluir que em vinhos tintos, o 4-etilguaicol é mais facilmente detectado que o 4-etilfenol, enquanto que em vinhos brancos o composto mais facilmente detectado é o 4-vinilguaicol. Os autores verificaram ainda que o 4-etilfenol, com o aumento das características fumado, animal e fenólico, pode alterar a elegância e o carácter frutado de um vinho (Barata, 2002). Por sua vez, o 4-etilguaicol em baixas concentrações, modera as características fenólicas e o cheiro a animal, com a evolução dos aromas a especiaria e madeira, impedindo a diminuição da elegância e do frutado do vinho (Gonçalves, 1996).

1.4.5. Factores que afectam o crescimento e a produção de fenóis voláteis

Os factores que afectam a produção de 4-etilfenol, especialmente no que diz respeito à produção de vinho, ainda não estão bem esclarecidos (Dias 2003). No entanto considera-se que além do etanol, outros factores como o SO₂ e a falta de oxigénio (Jensen *et al.*, 2009) podem influenciar o crescimento de varias espécies. Sabe-se também que a interacção entre os factores podem condicionar o crescimento estabelecendo a dinâmica da reacção.

1.4.5.1. Disponibilidade de O₂

Em 1940, quando Custers fez a primeira referência a *Brettanomyces* em vinhos mostrou que o oxigénio além de estimular a fermentação alcoólica promovia o crescimento destas leveduras (Miniac, 1989). Este efeito passou a designar-se “efeito Custers” e é definido como a inibição da fermentação em condições de anaerobiose, (Scheffers e Wikén, 1969 *cit in* Suárez *et al.*, 2007). Estudos realizados referem que a estimulação da fermentação alcoólica pelo receptor H como o oxigénio tem sido considerada como uma característica das leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* (Ciani *et al.*, 2003), apesar de nem todas as espécies de apresentarem tal efeito (Scheffers e Wikén, 1969 *cit in* Suárez *et al.*, 2007).

Ciani *et al.* (2003) estudaram o crescimento das leveduras *Brettanomyces/Dekkera* em diferentes condições de aerobiose. Isolaram *Brettanomyces* spp. e *Saccharomyces cerevisiae* em vinhos e submeteram-nos, durante a fermentação, às condições: semi-aerobiose, anaerobiose e anaerobiose estrita. Concluíram que o crescimento de *Brettanomyces* e a produção de ácido acético foi maior em ambiente semi-aeróbio e anaeróbio do que em anaerobiose estrita, apresentando neste caso, valores de acidez volátil duas vezes superior.

Considera-se que o oxigénio estimula o crescimento de leveduras do género *Dekkera* promovendo a produção de 4-etilfenol. Malfeito-Ferreira *et al.* (2001) observaram que mesmo em fracas concentrações de oxigénio (inferior a 2% da saturação), a quantidade de compostos fenólicos diminui cerca de 80%, não evitando, no entanto, a presença do cheiro fenolado característico.

Suárez, *et al.* (2007) adiantam que uma das formas de controlar o crescimento das leveduras do género *Dekkera* é manter as concentrações de oxigénio o mais baixos possível.

1.4.5.2. Temperatura

Vários estudos foram feitos com intenção de estabelecer os valores de temperatura onde o crescimento se dá com maior intensidade. Correia (2004) sugere que a temperatura por si só não faz aumentar a concentração de 4-etilfenol, promovendo antes o aumento da cinética da reacção que acelera o processo de transformação do ácido cinâmico em 4-vinilfenol e posteriormente a 4-etilfenol.

Dias *et al.* (2003) estudaram esta problemática e inocularam *D. bruxellensis* em amostras submetidas a várias temperaturas e verificaram que a densidade óptica (DO) das amostras a 30 °C era maior que a 16 °C. Apresentavam uma taxa de crescimento de 0.07 h⁻¹ a 30 °C e uma taxa de 0,02 h⁻¹ aquando uma temperatura de 16 °C. Os mesmos verificaram que a 30 °C, a produção de 4-etilfenol atinge o valor máximo de 620 µg/l nas primeiras horas. Contudo, o crescimento destas leveduras não é favorecido pela temperatura até certo ponto. Barata *et al.* (2008a) constataram que temperaturas de 30 °C a 35 °C as células perdem a viabilidade em menos de 12h e para temperaturas de 36 °C a 40 °C comprovaram que havia morte celular nas primeiras 24 h. Os mesmos autores observaram ainda que a 25 °C não houve morte celular e a produção de etilfenol aumento cerca de 400 µg/l. Blomqvist, *et al.* (2010) explicam que a temperatura mais baixas (25 °C) a solubilidade do oxigénio é maior. Jenssen *et al.* (2009) observaram que a 10 °C as leveduras *D. bruxellensis* não crescem, qualquer que seja o teor alcoólico.

Porém, a temperatura influencia assim como é influenciada por outros factores condicionando ou promovendo o crescimento dos microrganismos.

1.4.5.3. Teor Alcoólico

O processo de vinificação consiste na transformação dos açúcares do mosto da uva em etanol, o principal produto desta reacção. Vários foram os autores que estudaram a problemática da tolerância ao etanol por parte de leveduras *Dekkera/Brettanomyces*. Barata

et al. (2008b) concluíram que a 14 % (v/v) de etanol não se registou qualquer desenvolvimento celular, mesmo com pH 3,5. No entanto, nas mesmas condições de pH e a 12 % (v/v) de etanol observaram uma recuperação da viabilidade depois de uma fase de morte inicial. De acordo com Dias *et al.* (2003) o teor alcoólico influencia directamente a produção de 4-etilfenol. Teores superiores a 13% (v/v) de etanol resultam numa taxa de crescimento muito baixa e uma consequente produção de 4-etilfenol limitada.

Contudo, em interacção com outros factores, o teor alcoólico pode ter um comportamento determinante no crescimento de *D. bruxellensis*. Barata *et al.* (2008b), concluíram num estudo que em vinhos com pH 3,0 só se registou crescimento celular quando o teor de etanol foi de 8% (v/v). Contudo, a 14 % (v/v) de etanol as leveduras deste género perdem a viabilidade qualquer que sejam os valores de pH. Jensen *et al.* (2009) estudaram o crescimento celular de *D. bruxellensis* em condições de interacção temperatura/grau alcoólico e concluíram que pode haver uma conciliação dos factores permitindo uma optimização do ambiente, favorecendo o crescimento microbiano. Observaram que aumentando o grau volumétrico duma amostra, o crescimento continua possível aquando de um aumento da temperatura de incubação. Registaram crescimento celular em amostras com 14% (v/v) de etanol a 22 °C de temperatura.

1.4.5.4. Efeito dos Precursores

Os precursores da reacção de produção de fenóis voláteis são os ácidos cinâmicos, ácido p-cumárico, ferúlico e em menor quantidade o ácido cafeico. Estes ácidos estão presentes nas paredes celulares da uva (Lynd *et al.*, 2002) e todos os mecanismos de vinificação são potenciais fontes de extracção destes precursores. Quer os esmagamentos, as macerações prolongadas e outros tratamentos mais violentos contribuem para o aumento dos ácidos cinâmicos no vinho (Baumes *et al.*, 1986 *cit in* Correia 2004). O aumento da temperatura de maceração verificada no fim da fermentação pode aumentar também a extracção de compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos cinâmicos. É de referir que estes ácidos existem nas uvas em concentrações diferentes dependendo da casta, do sistema de condução e do processo de vinificação (Reguant *et al.*, 2000).

Dias *et al.* (2003) referem que também o 4-vinilfenol pode ser considerado como precursor, na formação de fenóis voláteis e na ausência do ácido cinâmico. Num trabalho experimental, estes autores estudaram o crescimento das populações em meios com adição

de 4-vinilfenol e concluíram que a produção de 4-etilfenol aumenta nas primeiras horas, chegando a uma concentração de 50 mg/l.

1.4.5.5. Teor de açúcares

Para que as leveduras do género *Dekkera* se possam desenvolver em vinhos depois da fermentação alcoólica, é necessário existir uma fonte de carbono e energia de onde os açúcares surgem como o substrato mais evidente (Barata, 2002). Contudo, Fugelsang *et al.* (1993) referem que existem outros substratos no vinho que podem ser consumidos, como o etanol e o acetato de etilo. Apesar do aumento da taxa de crescimento com o aumento da concentração de glucose, existe a possibilidade de populações de *Dekkera* se desenvolverem a níveis abaixo de 2 g/l (Fugelsang *et al.* 1993). Assim, ainda que limite técnico do teor de açúcares residuais num vinho seja de 2 g/l não significa que esta quantidade seja limitação para a produção de fenóis voláteis em concentrações significativas. De facto, também Barata *et al.* (2008a) verificaram que esta concentração de açúcares residuais é suficiente para permitir a produção de fenóis voláteis em quantidades consideráveis quando em conjunto com outros factores favoráveis ao crescimento deste género de leveduras. No mesmo sentido, Chatonnet *et al.* (1995) verificaram que um consumo de 300 mg/l de açúcares fermentescíveis (glucose, frutose, galactose) no caso de *Dekkera*, era suficiente para produzirem alterações aromáticas significativas nos vinhos. Acrescentaram ainda que essa quantidade de açúcar permite um desenvolvimento de mais de 3000 células/ml, densidade populacional suficiente para ultrapassar o limite de detecção do 4-etilfenol. No entanto, Massini *et al.* (s/d) concluiu que o teor de açúcar residual num vinho não é o factor que mais interfere no crescimento celular. Mesmo em ambientes de 6 g/L de açúcares residuais, aquando uma temperatura de 6 °C, não se observa crescimento celular nem produção de fenóis voláteis, porque a temperatura é o factor que mais prevalece. No entanto, refere que a uma temperatura de 22 °C, um teor elevado em açúcares parece ter um papel mais importante na produção destes compostos, já que as condições são mais favoráveis ao crescimento das leveduras produtoras de fenóis voláteis.

1.4.5.6. Efeito dos conservantes

Entre os conservantes possíveis está o dióxido de enxofre (SO_2), vulgarmente conhecido por sulfuroso. É considerado pelas suas propriedades: anti-sépticas, anti-oxidantes e anti-oxidásico, além de ajudar nos processos de maceração e na limpidez do aroma melhorando a prova. O dióxido de enxofre é por isso, considerado o mais comum dos inibidores ao crescimento das leveduras *Dekkera/Brettanomyces* (Suárez *et al.* 2007). No entanto existem outros conservantes possíveis na indústria vínica, o ácido sórbico e o dimetildicarbonato (DMDC).

O dióxido de enxofre surge nos vinhos em duas formas, livre ou combinado de forma reversível ou não. Os compostos para os quais têm afinidade de ligação são: açúcares e seus derivados, etanal, ácidos cetónicos, e compostos fenólicos (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006). Este composto é aplicado inúmeras vezes ao longo de todo o processo de vinificação, e é feito nas formas sólida, líquida ou gasosa. Pode usar-se o metabissulfito de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) na forma de cristais brancos, ou tradicionalmente usando mechas de enxofre. Podem ainda ser aplicadas soluções sulfurosas (5% a 6%) em água ou na forma gasosa com anidrido sulfuroso puro. Devido à elevada toxicidade este composto não deve ser usado de forma irresponsável. Ainda que nos últimos tempos se verifique uma diminuição de SO_2 nos vinhos, existe legislação limitando a quantidade de aplicação deste composto. Para vinhos com teor de açúcares inferior a 5 g/l o total de SO_2 permitido é 160 mg/l para vinhos tintos e 210 mg/l para brancos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Este conservante é também conhecido como meio de luta eficaz contra leveduras do género *Dekkera*. Fugelsang (1997) concluiu que 0,8 mg/l de SO_2 molecular é a quantidade necessária para reduzir as populações de *Dekkera* em cerca de 10^4 UFC/ml (em 24 h). Durante o envelhecimento em barricas, devido à sua superfície irregular, a desinfecção torna-se um processo difícil, constituído assim um óptimo refugio para as populações de *Dekkera*, já que sobrevivem a tratamentos de contacto limitado com o SO_2 (Suárez, 2007).

Massini *et al.* (s/d) estudou a influência da concentração de SO_2 em interacção com a temperatura com o crescimento celular em leveduras do género *Dekkera*. Concluiu que se a temperatura for baixa, o crescimento é baixo qualquer que seja a concentração de SO_2 livre. Se a temperatura for favorável, acima de 20°C , o crescimento é muito acentuado qualquer que seja a concentração de SO_2 livre. No entanto, Froudière e Larue (1988) observaram que 70 mg/l de SO_2 total era o limite de concentração deste conservante para as leveduras se manterem viáveis e se registar crescimento celular. No entanto, existem estudos controversos que referem a sua sensibilidade para valores superiores a 30 mg/l. Du Toit *et*

al. (2005) referem que manter os vinhos com valores de pH baixos é uma forma de potenciar as propriedades do SO₂, já que nestas condições este conservante existe na forma livre.

Outro dos conservantes usados em vinhos é o ácido sórbico, composto por uma cadeia de ácido gordo α - β -insaturado (Fugelsang, 1997). Devido à sua insolubilização pode ser aplicado na forma de sorbato de potássio. Este agente exerce um efeito selectivo sobre os microrganismos do vinho, opondo-se ao crescimento de leveduras sem no entanto interferir com o crescimento bacteriano (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006), apresentando um efeito contrário ao dióxido de enxofre. Deste modo, o ácido sórbico nunca deve ser aplicado sozinho, mas sempre associado a um outro produto anti-bacteriano como o SO₂. O limite legal de aplicação é de 200 mg/l, (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006). Esta concentração não influencia o aroma do vinho nem a acidez, mas acentua as sensações de amargor e adstringência. Renouf *et al.* (2008) alerta para a importância dos limites de aplicação, uma vez que as bactérias lácticas têm a capacidade de degradação do ácido sórbico, transformando-o em 2-etoxicarbonil-3,5-hexadieno responsável pelo descritor designado como gerânio. Este conservante constitui um adjuvante eficaz ao dióxido de enxofre reforçando a sua acção, mas não substituindo a sua aplicação.

Por último, o dimetildicarbonato (DMDC) é outro conservante bastante eficaz a baixas concentrações, contra uma grande variedade de leveduras e alguns fungos. Apresenta um efeito letal contra *Dekkera/Brettanomyces* mas em relação às bactérias são necessárias concentrações maiores deste conservante para que se verifique o mesmo efeito. A O.I.V. apresenta limites de 300 mg/l para vinhos tintos e 150 mg/l para vinhos brancos (Ribéreau-Gayon, *et al.* 2006), não apresentando, no entanto grande eficácia contra bactérias lácticas e acéticas, nestas concentrações (Renouf *et al.* 2008). Segundo o mesmo autor, o DMDC quando aplicado na dose máxima pode causar o aumento da concentração de metanol no vinho, composto extremamente para o consumo humano. Num estudo sobre a eficácia do DMDC na prevenção do crescimento de *Brettanomyces bruxellensis* nos vinhos, Renouf, *et al.*, (2008) concluíram que durante a fermentação alcoólica o crescimento era inibido com uma concentração de 150 mg/l de DMDC. Tendo em conta as suas propriedades, apresenta uma boa solução para a redução de SO₂ nos vinhos engarrafados, já que contribui para a prevenção de contaminações de leveduras em garrafas (Ribéreau-Gayon, *et al.* 2006). Terrel *et al.* (1993), referem que vinhos com elevado teor de etanol e um pH baixo favorecem a capacidade de esterilização por parte do DMDC.

1.5 Enquadramento e objectivos do trabalho

A susceptibilidade dos vinhos ao crescimento e à produção de fenóis voláteis de *D. bruxellensis* tem sido estudada em função de uma série de factores, como anteriormente descrito. De acordo com a bibliografia e os trabalhos realizados no Laboratório de Microbiologia do ISA, sabe-se que para avaliar o crescimento em condições comparáveis é necessário igualar os vinhos em termos de teor alcoólico, pH, acidez fixa e ausência de anidrido sulfuroso. Em conjunto, a temperatura de incubação também deve ser mantida constante, num valor escolhido entre 20 a 25°C. Por outro lado, a experiência empírica de muitos enólogos a nível mundial associa a maior susceptibilidade dos vinhos a determinadas castas, como a Touriga Nacional (em Portugal), a Syrah (na Austrália) e a Cabernet Sauvignon (em França). No entanto não existem dados científicos que corroborem estas observações, sendo plausíveis outras explicações relacionadas com a utilização destas castas para vinhos topo de gama (e. g. maior recurso a barricas de carvalho).

Assim, o objectivo deste trabalho foi aprofundar os factores que influenciam a susceptibilidade dos vinhos ao crescimento e produção de fenóis voláteis por *D. bruxellensis*, utilizando vinhos de castas elementares obtidos em diferentes regiões de Portugal.

2. Material e Métodos

2.1. Vinhos Analisados

Neste trabalho utilizaram-se sete amostras de vinhos tintos, elementares, das regiões do Ribatejo, Alentejo e Bairrada, obtidas a partir dos depósitos de armazenagem em aço inoxidável (Tabela 2.1). As castas Touriga Nacional, Syrah e Cabernet Sauvignon foram escolhidas pela suposta maior susceptibilidade ao aparecimento do defeito a “suor de cavalo”, enquanto a casta Baga foi escolhida como hipotética casta resistente. De facto, o vinho de Baga por ser 2006 e apresentar um teor de fenóis voláteis abaixo do limiar de detecção (ver ponto 1.4.4.1) sugere que possa ter maior robustez em relação a este defeito.

Tabela 2.1. Caracterização das amostras.

Amostras	Castas	Ano	Região	Produtor
TN_A	Touriga Nacional	2009	Alentejo	Herdade das Servas
TN_R	Touriga Nacional	2009	Ribatejo	Casa Cadaval
S_A	Syrah	2006	Alentejo	Ervideira
S_R	Syrah	2009	Ribatejo	Talhão S.A.
C_A	Cabernet Sauvignon	2009	Alentejo	Herdade das Servas
C_R	Cabernet Sauvignon	2009	Ribatejo	Casa Cadaval
B	Baga	2006	Bairrada	Quinta das Bageiras

Além destas amostras principais, usou-se um vinho tinto cedido pelo laboratório de Microbiologia com fins a trabalhos experimentais, para uma experiência antecedente, de avaliação da influência da concentração de taninos no crescimento de *Dekkera bruxellensis* ISA 1791.

2.2. Identificação e caracterização do meio de cultura

2.2.1. Estirpe utilizada e preparação do pré-inóculo

Este estudo teve por base a utilização de uma espécie de levedura escolhida da colecção do Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia. A levedura utilizada foi a *D. bruxellensis* com o número 1791 da colecção que tem sido usada em trabalhos anteriores pela sua capacidade de produzir elevadas quantidades de etilfenol (Rodrigues, 1997). As leveduras foram mantidas em tubo de meio inclinado com a seguinte composição: 0,3% (p/v) de extracto de levedura (Biokar), 0,5% (p/v) de peptona (Biokar), 5% (p/v) de glucose (Copam), 2% (p/v) de agar (Iberagar) e 0,5% (p/v) de carbonato de cálcio. O meio foi colocado em tubos de 16 mm (aproximadamente 5 ml por tubo) e esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Após a esterilização e antes do meio arrefecer os tubos foram colocados a 10° de inclinação por forma a garantir a inclinação do meio. Depois desta operação os mantiveram-se os tubos a 4°C.

2.2.2. Preparação do inóculo

Foi preparada uma suspensão concentrada de células a partir da cultura fresca em meio YNB (Difco) numa concentração de 0,67% (p/v) com 10% de etanol, e 2% de glucose, pH 3,5 e filtrado com membrana de 0,20 µm, 47 mm diâmetro (Millipore). A suspensão foi colocada em balões de Erlenmeyer homogeneizada e mantida em agitação orbital de 120 rpm à temperatura de 25 °C. Foi determinada a densidade óptica do inóculo com a leitura da absorvância a 640 nm, (Boeco S20 Spectrophotometer) no momento inicial e nos momentos seguintes acompanhando o seu aumento até atingir valores entre 0,2 e 0,5. Fizeram-se contagens por hemocítmetro das células viáveis de modo a poder calcular-se o volume exacto de suspensão a inocular.

2.3. Preparação dos vinhos

As amostras usadas foram todas submetidas a análises químicas e em certos casos foram acertados alguns parâmetros que poderiam condicionar o crescimento celular. Todas

as amostras foram submetidas a filtrações esterilizante com membrana de porosidade 0,22 µm e diâmetro 47 mm (Millipore). A manipulação das amostras foi sempre feita em câmaras de fluxo contínuo em condições de assépsia de modo a garantir a não contaminação das mesmas.

2.3.1. Análises químicas

As análises químicas feitas às amostras foram o teor alcoólico volumétrico, a acidez total, a acidez fixa, acidez volátil, pH, sulfuroso livre e sulfuroso total, os açúcares redutores e o índice de polifenóis totais (absorvância a 280 nm). As análises foram todas feitas de acordo com as normas O.I.V. (Anónimo, 2005).

2.3.2. Acertos dos parâmetros

O teor alcoólico das amostras foi ajustado a 12 % (v/v) através de uma diluição. Para este efeito, usou-se uma solução 5 g/l de ácido tartárico (Merck) de modo alterar o menos possível a acidez total. Esta decisão foi tomada com base nos resultados de uma pequena experiência em que se diluiu um vinho existente no laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia, diminuindo o seu teor alcoólico 2% com água destilada e com uma solução de água e ácido tartárico na concentração de 5 g/L. Concluiu-se que a acidez total da amostra permanecia praticamente a mesma aquando da sua correcção com a solução tartárica (resultados não apresentados). Nalguns casos foi preciso aumentar o teor alcoólico e para isso recorreu-se à adição de etanol (Merck) com 99% de pureza.

O pH das amostras foi acertado a 3,50 +/- 0,2, recorrendo a um potenciómetro (Radiometer). A solução utilizada para este efeito foi NaOH 1M (Merck) ou HCl 0,1M e 1M (Merck).

O sulfuroso livre presente nas amostras foi retirado com a adição de acetaldeído (Robéreau-Gayon *et al.*, 2006) nas concentrações necessárias de modo a eliminar a totalidade deste composto.

A acidez total foi acertada pelo valor da amostra com maior acidez, adicionando uma quantidade exacta de ácido tartárico (Fluka analytical, Alemanha).

A correcção do índice de polifenóis foi conseguida pela adição directa de tanino enológico. Utilizou-se o Tanisouple (Spindal AEB, Viseu, Portugal), um tanino elágico, com uma dose de utilização recomendada entre 5 e 40 g/ hL.

2.3.3. Inoculação

As células utilizadas na inoculação tiveram origem no inóculo preparado anteriormente, como foi referido no ponto 2.2.3. A concentração de inóculo pretendida era de 10^4 células/ml. Depois de calculado o volume certo a inocular, recorrendo às contagens por hemocitómetro, verificou-se que o volume a inocular era muito pequeno. Para facilitar este processo, recorreu-se à centrifugação (Centrifuge 5415 D) do volume total das amostras durante 5 minutos a 10000 rpm. Obteve-se um sobrenadante que foi desprezado e ressuspendeu-se de novo num volume conhecido de Solução de Ringer. Tendo sempre em atenção a homogeneidade da suspensão, distribui-se a totalidade da solução inóculo/solução de Ringer pelas amostras. Todos os processos depois da filtração foram realizados em condições de assépsia, em câmaras de fluxo, de modo a impedir ou minimizar a contaminação.

As amostras foram numa estufa a 25 °C enquanto se acompanhava o crescimento celular.

2.4. Estudo da viabilidade de *Dekkera bruxellensis*

2.4.1. Efeito de diferentes concentrações de taninos no crescimento da levedura *D. bruxellensis*

Para este fim usou-se um vinho tinto de lote, com o pH acertado a 3,5 o teor alcoólico a 12% (v/v) na ausência de sulfuroso livre. A amostra foi distribuída por tubos de ensaio com cerca de 25 ml. A cada tubo foi adicionada uma quantidade conhecida de tanino de modo a que a concentração final de cada amostra fosse 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L e um tubo de ensaio que serviu de testemunha onde não foi adicionado tanino. De seguida, as amostras foram inoculadas conforme descrito no ponto 2.3.3. e armazenadas em estufa a 25°C.

O crescimento microbiano foi acompanhado pela contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) em placas sólidas de GYP (0,5% (p/v) de extracto de levedura (Biokar), 0,5% (p/v) de peptona (Biokar), 2% (p/v) de glucose (Copam) e 2% (p/v) de agar (Iberagar)). Todos os espalhamentos foram feitos em duplicado com um volume de 100 µL. Atendendo à dificuldade da quantificação dos taninos, determinou-se o índice de polifenóis totais, por ser um método relativamente fácil, através da leitura da absorvância a 280 nm (Anónimo, 2005).

2.4.2. Crescimento da levedura *D. bruxellensis* em vinhos elementares

As amostras foram submetidas a análises químicas não sendo no entanto corrigidos quaisquer parâmetros, avaliando-se o desenvolvimento celular em vinhos nas condições elementares. As amostras (500 ml) foram reservadas em frascos Schott e a inoculação foi feita respeitando os passos descritos anteriormente. Foram armazenadas em estufa a uma temperatura de 25 °C enquanto se acompanhava o crescimento e a produção de 4-etilfenol.

2.4.2.1. Contagem das Células viáveis

As contagens celulares foram acompanhadas em placas sólidas de meio GYP com a constituição já referida no ponto 2.4.1. e nalguns casos recorrendo à filtração. Foram feitos espalhamentos das amostras imediatamente depois da inoculação, num volume de 100 µL e nos dias seguintes. A partir das 22 horas após a inoculação, prevendo-se a perda de viabilidade, as contagens foram feitas em placas de GYP nas condições já referidas e por filtração de 1 ml do volume das amostras. No fim do processo foi filtrado o volume remanescente e analisada a presença de células nas amostras. Todos os espalhamentos e filtrações foram feitos em duplicado e em ambiente de assépsia em câmaras de fluxo contínuo.

2.4.2.2. Extracção de 4-etilfenol

A extracção do 4-etilfenol consiste na separação da fase orgânica que é recolhida para análise de cromatografia gasosa e foi efectuada conforme o protocolo descrito por

Rodrigues *et al.* (2001). Este procedimento é realizado de uma amostra de 50 ml vinho de pH 8 acertado com NaOH (Merck) 10M e 1M, à qual se adicionam 0,5 mL de uma solução de 3,4-dimetil-fenol (padrão Interno). A extracção é feita em três fases. Na primeira adicionam-se 4 ml de uma mistura de éter-hexano (1:1) (éter dimetílico Merck e hexano Merck) em balões Erlenmeyer de 50 ml, e nas seguintes adicionam-se apenas 2 ml a cada uma. Depois de cada adição submetem-se as amostras a uma agitação durante cinco minutos. Recorrendo-se a ampolas de decantação recolhem-se as fases orgânicas, depois de cada agitação, para frascos, rigorosamente identificados. Finalmente, a emulsão da fase orgânica é quebrada com um agitador magnético e a fase aquosa pipetada cuidadosamente com pipetas de Pasteur para vials (Chromacol) identificados. O extracto foi analisado imediatamente sempre que possível. No entanto, quando isto não acontecia, os tubos eram reservados no congelador (-4°C) antes de ser analisados em cromatografia gasosa. Para a análise foi usado num cromatógrafo gasoso (Fisons 8000) constituído por uma coluna DB-Wax (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, J&W Scientific) e um injector split/splitless que injecta um volume de 2 µL. O gás de arraste é o hidrogénio a 100 kPa (2,8 ml/min) e a separação dos compostos é conseguida por um detector FID. Ao cromatógrafo está acoplado um computador equipado com o programa Chrom-Card para Windows (Fisons) que permite a obtenção dos dados. O cromatógrafo foi calibrado com soluções padrão de concentrações conhecidas e as amostras injectadas em duplicado (Anexo 1).

As extracções de 4-etilfenol foram feitas em 6 momentos diferentes, antes da inoculação, passados 5 dias, 10, 20 e 30 dias. Por fim foi feita uma última extracção quando se deu por terminado este procedimento experimental.

2.4.3. Crescimento em vinhos com parâmetros analíticos equivalentes

Os acertos dos parâmetros analíticos tiveram por base as análises químicas efectuadas. O objectivo era neutralizar os factores principais de inibição do crescimento de *D. bruxellensis* e produção de 4-etilfenol. Assim, os parâmetros corrigidos foram: o pH, o teor alcoólico, a acidez total, o índice de polifenóis total e eliminação da totalidade do sulfuroso livre existente. As amostras foram analisadas de novo, de modo a garantir que todos os parâmetros estavam dentro dos valores pretendidos. O ajuste da concentração de taninos foi conseguido com os resultados do ponto experimental 2.4.1, onde foi estabelecida

uma relação entre a quantidade de taninos adicionada e a variação do índice de polifenóis totais (Anexo 2).

A inoculação foi feita seguindo a ordem descrita no ponto 2.3.3. com recurso a uma câmara de fluxo contínuo garantindo todas as condições de assépsia. As amostras (100 ml) foram reservadas em balões de Erlenmeyer, protegidas com rolhas de borracha de modo a minimizar as perdas por evaporação. Enquanto era acompanhado o crescimento celular e a concentração de 4-etilfenol as amostras foram reservadas em estufa a uma temperatura de 25 °C.

2.4.3.1. Contagem das células viáveis e extracção de 4-etilfenol

A contagem das células foi feita em placas de GYP, sempre em duplicado. De modo a rentabilizar as placas, e atendendo ao número elevado de amostras e respectivas diluições, foi utilizada a técnica de spot colocando 25 µL por cada ponto experimental. O acompanhamento do crescimento celular foi feito imediatamente depois da inoculação e nos dias seguintes, sempre em duplicado e respeitando as condições de assépsia. A primeira contagem foi feita imediatamente depois da inoculação.

A extracção de 4-etilfenol foi feita de acordo com o descrito no ponto 2.4.2.2 antes da inoculação, sensivelmente no meio do processo (17 dias depois da inoculação) e no fim de toda esta parte experimental.

2.4.3.2. Análise por HPLC (Cromatografia líquida de alta performance)

A análise por HPLC (High performance liquid chromatography) foi feita em três momentos do processo experimental, antes da inoculação, sensivelmente no meio do processo (17 dias depois da inoculação) e no momento em que se considerou o fim deste procedimento experimental. Por HPLC foram analisados os compostos considerados importantes para avaliar a evolução das amostras ao longo do tempo, durante o processo de crescimento celular. Os constituintes analisados foram: ácido tartárico, glucose, ácido galacturónico, frutose, ácido succínico, ácido láctico, glicerol, ácido acético e o etanol. Os resultados dos outros constituintes constam em anexo (Anexo 3).

Para esta análise foi retirado 1 ml de cada amostra ao qual é adicionada arabinose (padrão interno) na concentração de 10 g/l numa proporção de 1:1 (v/v). Depois da adição de cerca de 2 g de carvão, as amostras foram submetidas a uma centrifugação de 12 000 rpm durante 5 minutos (Centrifuge 5415 D). O líquido translúcido (1ml) obtido foi filtrado com seringas (Inserpor) e filtros de Nylon de 0,2, 13 mm (Frilabo) e transferido para vials do HPLC rigorosamente identificados. O líquido filtrado foi injectado numa coluna (Schodex 1011) mantida a 65°C. A fase móvel usada era constituída por 2.5 mM de ácido sulfúrico, com um fluxo de 0,6 ml/min. A separação dos constituintes foi conseguida por detecção num índice de refração (486 Waters Corporation, Milford, MA) e os resultados foram processados utilizando o software do HPLC (Empower). O HPLC foi calibrado com soluções padrão de concentrações conhecidas e as amostras foram injectadas em duplicado (Anexo 4).

3. Resultados e Discussão

3.1. Análises químicas das amostras

Os vinhos usados no estudo do efeito de diferentes concentrações de taninos foram acertados a valores de pH 3,5 e a 12% (v/v) de etanol com a eliminação de todo o sulfuroso livre existente. Estas foram as condições escolhidas de modo a garantir um ambiente preferencial para *Dekkera bruxellensis*. Na tabela 3.1 estão indicados os valores das análises iniciais e no fim dos seus acertos.

Tabela 3.1. Análises químicas do vinho usado na experiência de avaliação da influência dos taninos.

Parâmetro Químico	Valores Iniciais	Valores Finais
Grau alcoólico volumétrico a 20°C (%)	14,2	12
Acidez Volátil em ácido acético (corrigida) (g/l)	-	0,78
pH	3,29	3,50
Anidrido Sulfuroso livre (mg/l)	9	2
Anidrido Sulfuroso total (mg/l)	80	64

Para o estudo da viabilidade de *Dekkera bruxellensis* as amostras foram também submetidas a análises químicas (tabela 3.2). Os resultados serviram para determinar o acerto das amostras na avaliação do crescimento e produção de 4-etilfenol em vinhos com parâmetros analíticos equivalentes. Por uma questão prática a designação das castas feita nas tabelas seguintes é apresentada com as iniciais da casta e da zona proveniente.

Tabela 3.2. Análises químicas das amostras de vinho.

Parâmetro Químico	TN _A	TN _R	S _A	S _R	CS _A	CS _R	B
Grau alcoólico volumétrico a 20°C (%)	14,2	13,2	13,0	13,0	15,1	12,9	12,7
Acidez total em ácido tartárico (g/l)	4,7	5,4	6,6	4,7	5,3	5,7	6
Acidez fixa em ácido tartárico (g/l)	3,9	4,7	5,8	4,1	4,5	5,1	5
Acidez volátil em ácido acético (corrigida) (g/l)	0,62	0,58	0,61	0,45	0,61	0,52	0,79
pH	3,7	3,8	3,2	3,6	3,6	3,7	3,3
Anidrido sulfuroso livre (mg/l)	22	19	19	22	16	25	19
Anidrido sulfuroso total (mg/l)	74	93	121	83	99	90	128
Açúcares redutores (g/l)	3,5	2,1	5,3	1,5	8,7	2,5	1,7
Índice de polifenóis totais 280 nm	77,1	74,8	75,4	52,5	97,5	58,8	68,2

Depois de avaliados os métodos para o acerto dos parâmetros, foi essencial uma nova análise para garantir que os valores se aproximavam o mais possível dos pretendidos. Por uma questão prática a designação das castas feita nas tabelas seguintes é apresentada com as iniciais da casta e da zona proveniente.

Tabela 3.3. Análises químicas do vinho no final do acerto dos parâmetros.

Parâmetro Químico	TN _A	TN _R	S _A	S _R	CS _A	CS _R	B	Valor pretendido
Grau alcoólico volumétrico a 20°C (%)	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12
Acidez total em ácido tartárico (g/l)	6,7	6,7	6,7	6,6	6,6	6,6	6,7	7
pH	3,52	3,51	3,50	3,50	3,49	3,50	3,51	3.5
Anidrido sulfuroso livre (mg/l)	7	8	6	7	8	6	8	0
Índice de polifenóis totais 280 nm	74	74	74	81	77	80	75	78

3.2. Estudo da viabilidade de *Dekkera bruxellensis*

3.2.1. Efeito do teor de taninos

As curvas de crescimento em vinho tinto com diferentes teores de tanino correspondem ao comportamento típico de *D. bruxellensis* (figura 3.1). No início existe uma fase de morte parcial com recuperação da viabilidade ao longo do tempo. A morte celular foi mais acentuada e aconteceu mais cedo em função da concentração de tanino. No entanto, apesar da morte inicial verificada, observou-se recuperação da viabilidade das células. Após 12 dias, todas as amostras permitiram a obtenção de uma fase exponencial de crescimento. Após esta fase, a concentração máxima celular foi semelhante, independentemente do teor de taninos.

As diferentes fases de crescimento de *D. bruxellensis* e a taxa de morte dependem essencialmente do stress exercido e das condições a que são submetidas as populações (Barata, *et al.* 2008b). À partida parece que a concentração de taninos não é por si só, um factor condicionante no crescimento deste género de levedura. No entanto, em condições de maior stress e em interacção com outros factores, o teor de taninos pode potenciar a morte celular. Por isso, os resultados apresentados demonstram que concentração de taninos é um factor que deve ser considerado na avaliação da susceptibilidade ao crescimento desta levedura.

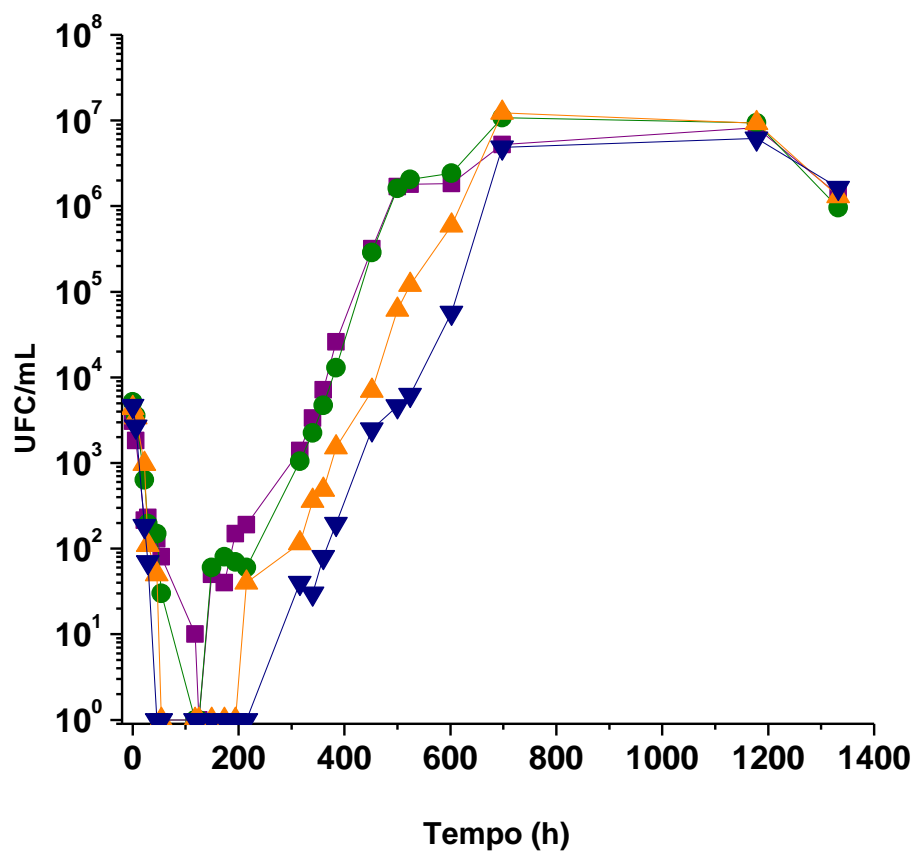


Figura 3.1 Crescimento de *D. bruxellensis* ISA 1791 na concentração inicial 10^4 células/ml em vinho como resposta a diferentes concentrações de tanino. Símbolos (■) Testemunha, (●) 0,5 g/l tanino, (▲) 1 g/l tanino, (▼) 2 g/l tanino. Nota: o valor 1 no gráfico corresponde a ausência de viabilidade em cerca de 20 ml).

3.2.2. Crescimento e produção de 4-etilfenol em vinhos elementares

Os vinhos de castas elementares foram primeiramente testados sem alteração da sua composição química (tabela 3.2). Os resultados do crescimento das populações nestas condições estão apresentados na tabela 3.4. As primeiras contagens foram feitas imediatamente depois da inoculação de cada amostra. Observou-se que a concentração de inóculo que se pretendia 10^4 cel/ml, só foi conseguida no caso da amostra da casta Syrah alentejana. Embora tal possa ser devido a erros na contagem celular, é possível que se tenha registado morte celular logo desde o início. De facto, logo após 6 horas deixou de se registar viabilidade em 449 ml de amostra. Nas contagens seguintes a morte celular manteve-se em todas as amostras, sem se verificar a sua recuperação ao longo do tempo.

Ao fim de vinte e sete dias deu-se por terminada esta parte experimental. Nesta altura, foi feita uma filtração de todo o volume remanescente (cerca de 140 ml), e inoculação em meio de cultura, onde se verificou a ausência de populações viáveis nas amostras.

Tabela 3.4. Viabilidade (UFC/ml) de *Dekkera bruxellensis* ISA 1791 ao longo do período de incubação (horas).

Amostras	0	6	30	47	166	406	646 ^a
TN_A	7200	<1	<1	<1	<1	<1	<1
TN_R	5400	<1	<1	<1	<1	<1	<1
S_A	10800	<1	<1	<1	<1	<1	<1
S_R	8050	<1	<1	<1	<1	<1	<1
CS_A	7350	<1	<1	<1	<1	<1	<1
CS_R	7300	<1	<1	<1	<1	<1	<1
B	4900	<1	<1	<1	<1	<1	<1

^a Viabilidade determinada após filtração do vinho remanescente (cerca de 140ml).

No que respeita à evolução de fenóis voláteis, a extracção de 4-etilfenol foi feita em 5 momentos diferentes (tabela 3.5). No início do processo experimental as amostras que continham 4-etilfenol foram apenas os vinhos das castas Touriga Nacional Ribatejo (TN_R) e Baga (B). No entanto, os valores apresentaram-se estáveis ao longo do tempo, o que era de esperar pois não foram detectadas populações viáveis de *D. bruxellensis*. A variabilidade dos teores determinados ao longo do tempo deve ser atribuída ao procedimento experimental. Em qualquer caso, as concentrações deste fenol volátil ficaram abaixo do limiar sensorial de detecção (ver ponto da tese 1.4.4.1).

Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois pela experiência do Laboratório de Microbiologia, não se consegue crescimento em vinhos com mais de 12-12,5 % (v/v) de etanol inoculados estirpes crescidas *in vitro*. Outro resultado interessante, demonstrou que mesmo na presença de açúcar residual elevado (5,3 g/l e 8,7 g/l, nas amostras S_A e CS_A) não se observou crescimento celular.

Tabela 3.5. Concentrações de 4-etilfenol (ppb) de *Dekkera bruxellensis* ISA 1791 em amostras em cinco tempos diferentes.

Amostras	0	47	166	406	646
TN_A	0	0	0	0	0
TN_R	88	98	121	152	129
S_A	0	0	0	0	0
S_R	0	0	0	0	0
CS_A	0	0	0	0	0
CS_R	0	0	0	0	0
B	224	199	241	229	296

3.2.3. Crescimento em vinhos com parâmetros analíticos equivalentes

A viabilidade das leveduras *D. bruxellensis* foi acompanhada pelas contagens de colónias, depois das amostras preparadas conforme descrito anteriormente, de modo que a diferente composição química associada a cada casta fosse a única variável responsável pela evolução das populações. A figura 3.2 mostra as diferentes evoluções da viabilidade de *D. bruxellensis* em todas as castas.

A amostra TN_R da casta Touriga Nacional perdeu a viabilidade quinze dias depois da inoculação, culminando com a morte celular. Tal facto deveu-se a contaminação por bactérias acéticas, pelo que esta amostra não pode ser considerado neste estudo comparativo.

Uma primeira observação que indique a maior susceptibilidade de determinado vinho pode ser o teor máximo de células viáveis obtido. Assim, pela figura 3.2, percebe-se que o vinho de Cabernet Sauvignon (Alentejo) e de Touriga Nacional (Alentejo) foram o que permitiram maior crescimento. Na fase inicial, os vinhos de Syrah e de Cabernet Sauvignon (Ribatejo) apresentaram contagens semelhantes entre si. O vinho de Baga foi o que registou o menor teor de células viáveis. Outro aspecto que distingue a casta Syrah das restantes é a perda contínua de viabilidade, obtendo-se uma curva típica em forma de sino. Pelo contrário as outras castas não mostraram uma quebra tão acentuada de viabilidade após terem atingido o máximo de concentração.

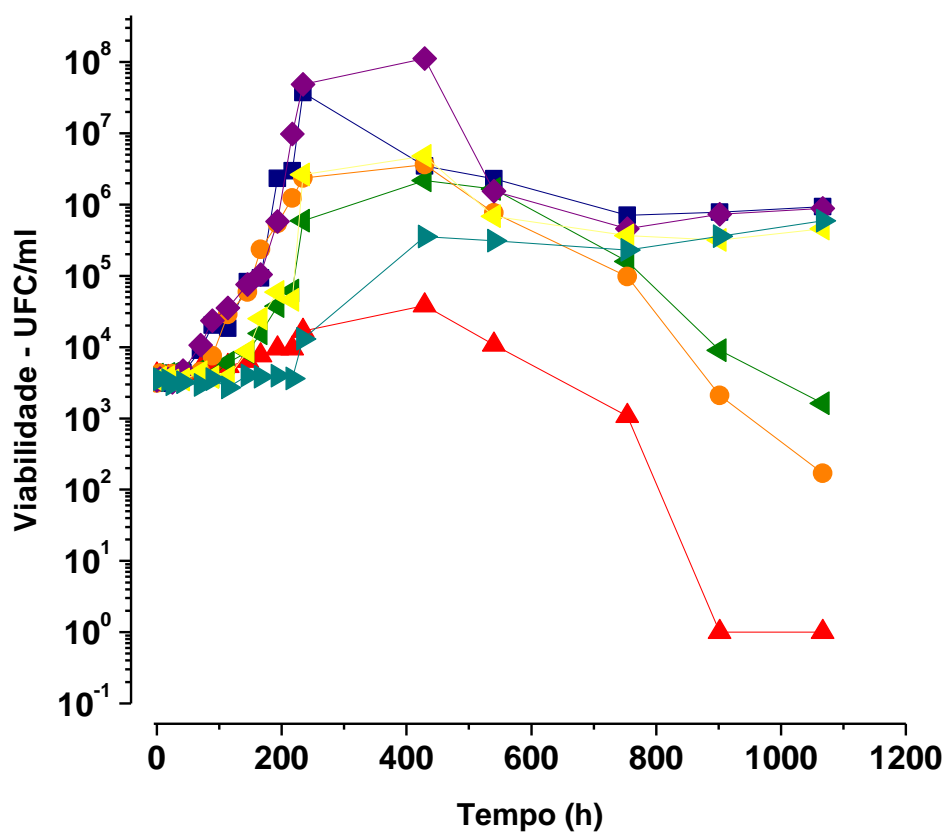


Figura 3.2. Crescimento da estirpe *D. bruxellensis* ISA 1791 com concentração inicial de 10^4 células/ml. Símbolos (■) Touriga nacional Alentejo, (▲) Touriga Nacional Ribatejo, (▼) Syrah Alentejo, (●) Syrah Ribatejo, (◆) Cabernet Sauvignon Alentejo, (▼) Cabernet Sauvignon Ribatejo, (►) Baga.

A determinação da viabilidade foi acompanhada pela avaliação dos metabolitos produzidos ou consumidos ao longo do processo, que podem explicar o comportamento celular (tabela 3.6). De facto, o vinho com maior crescimento (CS_A) também possuía um maior teor de açúcares, o que pode explicar a sua maior susceptibilidade. No entanto, também é possível pensar que, pelo facto de ter 15,1% de etanol, necessitou de maior diluição para chegar a 12% e, por conseguinte, ter menor teor em algum composto inibitório desconhecido. O vinho seguinte de concentração de açúcares mais reduzida (S_A, com 4,65 g/l), registou um menor aumento celular do que o vinho TN_A, com um teor de glucose mais reduzido (2,62 g/l).

Em termos de outros compostos que possam servir como fonte de carbono e energia para *D. bruxellensis* temos o caso do ácido láctico e do etanol. Ambos registaram, em termos globais, uma redução, particularmente após 429 h de incubação. Como estes compostos são utilizados em condições de aerobiose e as condições do ensaio permitem o

contacto com o ar, particularmente, em períodos longos de incubação, é de supor que não justifiquem o crescimento máximo celular verificado antes de 429 h de incubação. De notar que se verificou pela análise de HPLC cerca de menos 2% de etanol do que o esperado pelo método ebulliométrico, mas em termos relativos, esta diferença não invalida o raciocínio apresentado.

Em relação, ao aumento da acidez volátil, verificado em todos os casos estará relacionado com a conhecida produção por esta espécie de leveduras, uma vez que não se observou presença de contaminantes bacterianos. No entanto, o valor mais alto observado nos vinhos de Syrah podem explicar a observada maior perda de viabilidade na fase final de morte celular. O vinho Baga foi onde se registou o menor aumento de ácido acético, o que pode estar relacionado com o menor crescimento celular observado.

Tabela 3.6. Concentração dos compostos, pelo método HPLC das amostras Touriga Nacional Alentejo e Ribatejo.

	Tempo (h)	Ácido Tartárico (g/l)	Glucose (g/l)	Frutose (g/l)	Ácido Láctico (g/l)	Ácido Acético (g/l)	Etanol (g/l)
TN_A	0	3,68	2,62	0,00	3,07	0,64	10,30
	429	3,60	0,00	0,37	2,29	1,11	10,35
	1067	4,82	0,00	0,20	1,92	1,43	9,91
S_A	0	3,71	2,57	2,08	1,75	1,13	9,24
	429	3,90	0,00	0,00	2,91	1,04	10,11
	1067	4,00	0,00	0,00	1,03	2,65	8,21
S_R	0	3,91	0,00	0,79	3,26	1,29	9,40
	429	3,40	0,00	0,19	2,91	2,00	10,10
	1067	3,86	0,00	0,00	1,46	2,86	8,47
CS_A	0	4,05	2,24	4,97	1,91	0,61	9,48
	429	4,13	0,00	0,29	1,71	1,05	10,61
	1067	3,94	0,00	0,25	1,20	1,12	8,85
CS_R	0	3,57	0,00	0,00	5,10	0,71	10,03
	429	2,22	0,00	0,00	4,55	1,04	9,92
	1067	3,34	0,00	0,00	3,46	1,09	8,70
B	0	3,09	0,00	0,00	3,04	1,19	10,00
	429	2,47	0,00	0,00	2,78	1,15	9,81
	1067	3,40	0,00	0,00	2,11	1,30	8,26

3.2.3.1 Produção de 4-etilfenol

A produção de 4-etilfenol na casta Touriga Nacional Alentejana está apresentada na figura 3.3. Como esperado, a produção foi mais reduzida quando o crescimento foi inibido pela contaminação com bactérias acéticas (amostra TN_R). Na amostra TN_A a produção de 4-etilfenol seguiu o andamento esperado, com a maior parte sendo produzida logo após o máximo de viabilidade celular. Este comportamento foi semelhante nas duas amostras da casta Syrah (figura 3.4), com diferença de que a seguir ao máximo de 4-etilfenol não houve produção adicional. Tal facto pode ser explicado pela perda de viabilidade neste caso, enquanto no vinho de Touriga Nacional a viabilidade não registou uma diminuição tão acentuada ao longo do tempo.

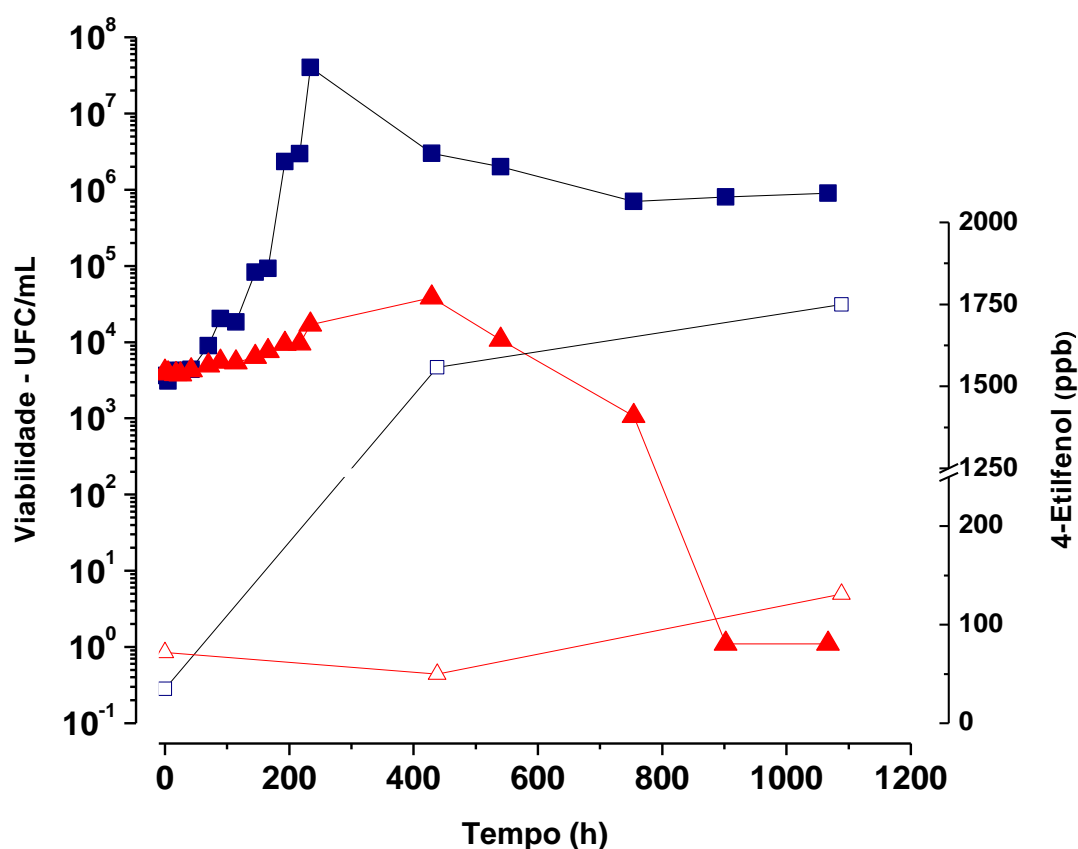


Figura 3.3. Crescimento e produção de 4-etilfenol da estirpe *D. bruxellensis* ISA 1791 na concentração inicial de 10^4 células/ml em vinho da casta Touriga Nacional. Símbolos (■) TN Alentejo; (▲) TN Ribatejo; (□) 4-etilfenol TN Alentejo; (△) 4-etilfenol TN Ribatejo.

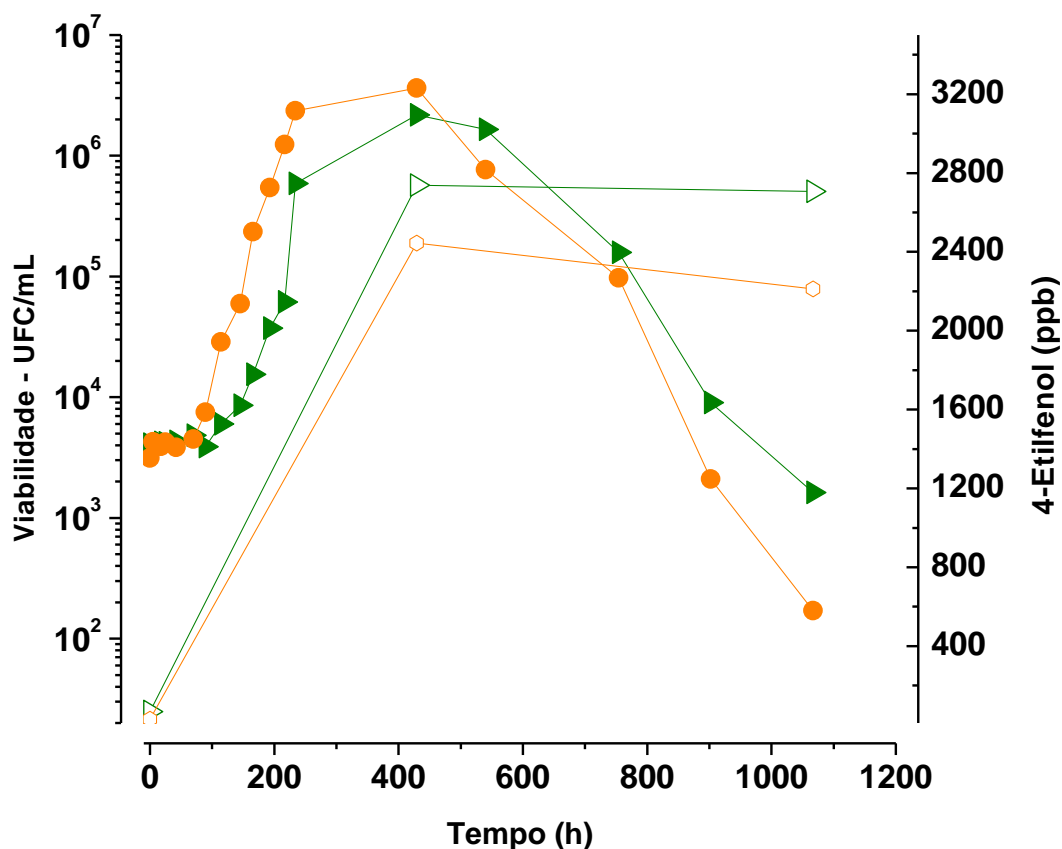


Figura 3.4. Crescimento e produção de 4-etilfenol da estirpe *D. bruxellensis* ISA 1791 na concentração inicial de 10^4 células/ml em vinho da casta Syrah. Símbolos (◄) Syrah Alentejo; (●) Syrah Ribatejo; (◄) 4-etilfenol Syrah Alentejo; (○) 4-etilfenol Syrah Ribatejo.

As curvas de produção de 4-etilfenol na casta Cabernet Sauvignon apresentam semelhanças entre si (figura 3.5) e próximas da observada na Touriga Nacional. O facto de numa das amostra existir maior número de células, devido ao maior teor de açúcar, pode justificar o consumo total de ácido *p*-cumárico até às 429 h, pelo que a seguir o teor de 4-etilfenol se mantém. Este facto evidencia a necessidade de se proceder à determinação deste precursor em próximos ensaios.

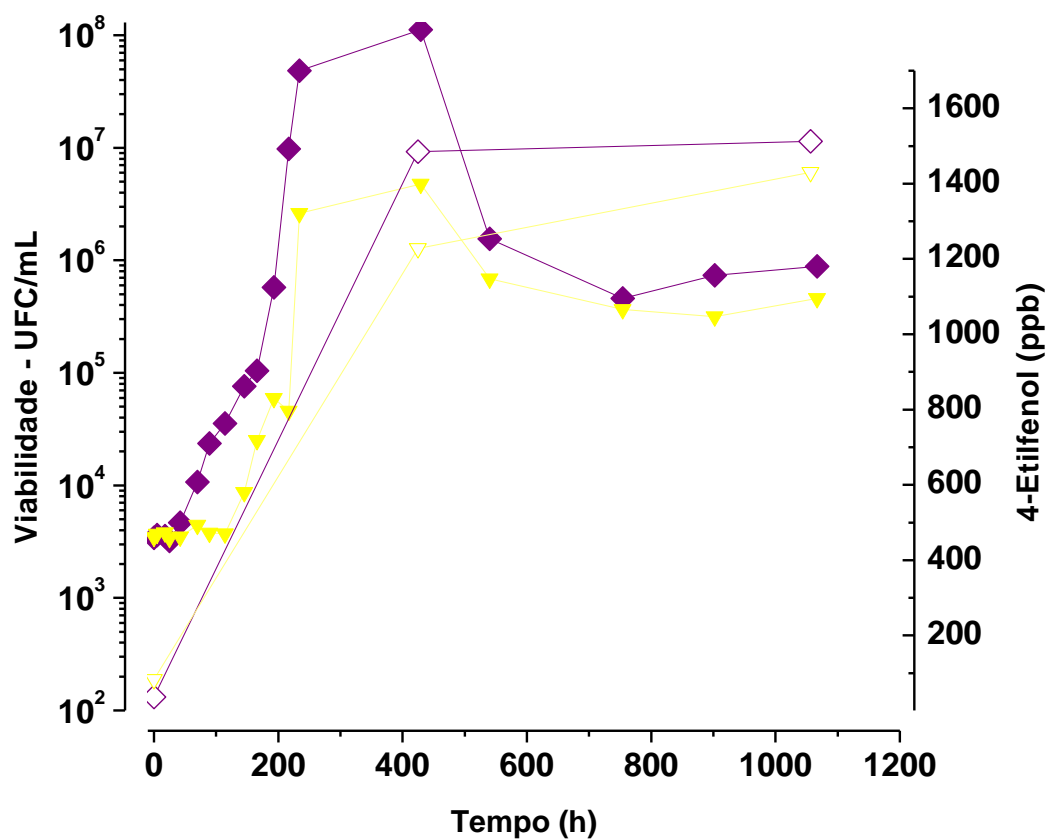


Figura 3.5. Crescimento e produção de 4-etilfenol da estirpe *D. bruxellensis* ISA 1791 na concentração inicial de 10^4 células/ml em vinho da casta Cabernet Sauvignon. Símbolos (◆) CS Alentejo; (▼) CS Ribatejo; (◇) 4-etilfenol CS Alentejo; (▼) 4-etilfenol CS Ribatejo.

O vinho de Baga apresentou um comportamento diferente dos anteriores tendo-se verificado um aumento contínuo de teor de 4-etilfenol (figura 3.6). Tal pode ser explicado pela ausência de morte celular que, na presença eventual de ácido *p*-cumárico, permite a sua metabolização pelas células viáveis. Resta saber qual o tempo necessário para o aparecimento da fase de morte celular e quais as razões para esta aparente maior resistência inicial ao crescimento microbiano.

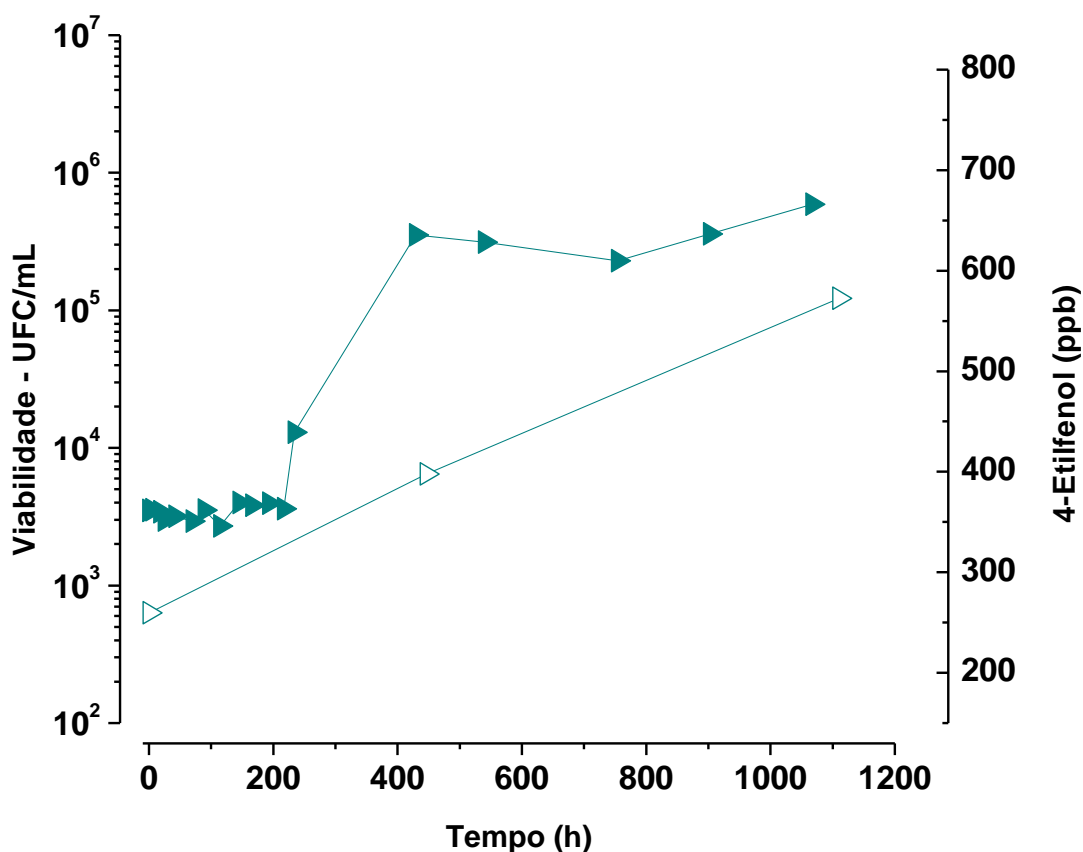


Figura 3.6. Crescimento e produção de 4-etilfenol da estirpe *D. bruxellensis* ISA 1791 na concentração inicial de 10^4 células/ml em vinho da casta Baga. Símbolos (>) Baga; (<) 4-etilfenol.

3.2.3.2 Rendimentos da produção de 4-etilfenol

O rendimento da produção em 4-etilfenol depende da quantidade de biomassa presente, sendo necessário haver crescimento para se registar produção deste metabolito (Barata *et al.*, 2008a). Com base nos valores obtidos por estes autores é possível verificar se os rendimentos por unidade de biomassa (log CFU) verificados nestes ensaios correspondem ao esperado.

Os rendimentos calculados para os diferentes vinhos estão apresentados na tabela 3.7., assumindo que todo o ácido *p*-cumárico foi consumido ao fim de 429 h, excepto no caso da Baga. Os valores apresentados variaram entre 140 4-EF/log CFU e 978 4-EF/log CFU. Estes valores estão dentro da gama verificada por Barata *et al.* (2008a), excepto no caso em que, para uma temperatura de incubação de 25 °C, os autores obtiveram um rácio de 1882 4-EF/log UFC.

De acordo com os resultados apresentados a amostra da casta Syrah foi onde se observou maior rendimento, indicando possivelmente um maior teor de ácido p-cumárico. A casta Baga foi a de menor rendimento, embora o diferente comportamento celular e ausência de teor máximo produzido de 4-etilfenol, não permitam avaliar este rendimento nos mesmos termos.

Tabela 3.7. Rendimento da produção de 4-etilfenol das amostras.

	TN_A	S_A	S_R	CS_A	CS_R	B
4-EF (inicial) (ppb)	35	68	29	37	83	260
4-EF (429 h) (ppb)	1558	2737	2444	1485	1228	398
4-EF (1067 h) (ppb)	1750	2707	2212	1512	1430	572
Δ4-EF [inicial, 1067 h]	1523	2669	2415	1448	1145	312
Δlog UFC	2,98	2,73	3,06	4,46	3,14	2,23
4-EF/logUFC	511	978	789	324	365	140

4. Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuíram para uma melhor compreensão da susceptibilidade dos vinhos ao crescimento e produção de fenóis voláteis por *D. bruxellensis*.

Em primeiro lugar foi possível demonstrar que o teor de taninos é mais um factor a ter em conta na diferente susceptibilidade ao crescimento, sendo de esperar que vinhos mais taninosos sejam mais resistentes ao crescimento de *D. bruxellensis*. Embora, sem conduzir a morte celular completa, sob os teores testados, é de supor que em condições de maior stress, por interacção com outros factores inibitórios possa contribuir para a morte celular irreversível. Os teores de taninos foram acertados para 78 de índice de polifenóis totais, o que nos indica que trabalhámos com valores normais de taninos nos vinhos.

No que respeita à avaliação do crescimento de *D. bruxellensis* ISA 1791 em amostras de vinho nas condições em que são produzidos, não se registou qualquer crescimento o que sugere que a levedura usada não se encontrava adaptada ao crescimento nestes vinhos. O factor determinante deve ser o teor em álcool, pois quando se igualaram todos os vinhos a 12% (v/v) houve sempre crescimento. Assim, a avaliação da susceptibilidade dos vinhos das diferentes castas deve ser feita igualando o teor de etanol, o pH, o teor de taninos, a acidez total e na ausência de dióxido de enxofre livre.

A comparação entre as susceptibilidade das diferentes castas ao crescimento da levedura não permite tirar conclusões definitivas, mas contribuiu notoriamente para o desenvolvimento futuro destes ensaios. De facto, houve semelhança entre o comportamento observado em Touriga Nacional e em Cabernet Sauvignon, embora só se tivesse testado um vinho da primeira casta. A diferença para a casta Syrah prendeu-se com a perda de viabilidade, mais acentuada nesta casta após o crescimento ter atingido o máximo. Este facto pode ser devido à produção de ácido acético que, conjugada com o decréscimo de etanol e ácido láctico em experiências longas, sugere que este tipo de ensaios laboratoriais devam ser de duração mais reduzida.

Em conjunto, observou-se que as amostras onde se registou um crescimento celular maior não foram aquelas onde a produção de 4-etilfenol foi superior. Isto sugere que os teores de ácidos cinâmicos sejam um parâmetro a determinar no futuro pois só assim se poderão avaliar rigorosamente os rendimentos na produção de 4-etilfenol. Este facto torna-se ainda mais evidente se se tiver em atenção que a casta Cabernet Sauvignon alentejana foi a que apresentou uma maior densidade populacional fruto da maior concentração de

açúcares, mas que não se reflectiu numa maior concentração de 4-etilfenol. A fonte de carbono responsável pela reacção de formação de fenóis voláteis (glucose e frutose) não foi neste caso o factor limitante, indicando que provavelmente será o teor em ácido *p*-cumárico, o factor condicionante. A par disto, e como já foi referido, o facto da amostra da casta Syrah ter a maior produção de ácido acético e uma baixa concentração de ácido láctico pode ter contribuído para uma fraca eficácia na reacção de produção de fenóis voláteis. Contudo, a explicação para os níveis mais elevados de 4-etilfenol e de maior rendimento na casta Syrah deve ter a ver com o teor de ácido *p*-cumárico.

A amostra da casta Baga apresentou um comportamento diferente das outras castas tanto no crescimento celular como na produção de fenóis voláteis. Ainda que só se tenha analisado uma amostra, os resultados demonstram o interesse de considerar esta casta como eventualmente resistente ao crescimento de *Dekkera*. De facto, não só se observou uma maior fase de latência como o vinho analisado era de 2006 e apresentava um teor reduzido de 4-etilfenol. Neste caso o teor de ácido *p*-cumárico não deve ser limitante pois houve um aumento contínuo do 4-etilfenol ao longo do tempo.

Apesar dos resultados obtidos fornecerem alguns dados, não permitem, contudo, tirar uma conclusão acerca da susceptibilidade do factor casta. Se por um lado, a concentração de ácidos cinâmicos, nomeadamente o ácido *p*-cumárico, parece ser factor limitante na produção de 4-etilfenol, a composição química da amostra, principalmente no que respeita à fonte de carbono (glucose e frutose) parece ser essencial para a viabilidade destas leveduras. Os dados conseguidos neste estudo, sugerem que a casta por si só, não constitui um factor de maior ou menor susceptibilidade na produção de fenóis voláteis.

5. Bibliografia

Barata, A., 2002. Detecção, identificação e comportamento de *Dekkera bruxellensis* em vinhos. Relatório de Estágio. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.

Barata, A., Pagliara, D., Piccininno, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M. e Loureiro, V., 2008a. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. Federation of European Microbiological Societies, **8**: 1097 - 1102.

Barata, A., Cladeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008b. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. International Journal of Food Microbiology, **121**: 201 - 207.

Barnett, J. A., Payne, R. W. e Yarrow, D., 1990. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge. 2nd ed.

Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnurer, J. e Passoth, V., 2010. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. Applied Microbial and Cell Physiology, **87**: 1487 - 1497.

Chatonnet, P., Debordieu, D., Boidron, J. N., 1992. Le caractère phénolé des vins rouges. Caractérisation, origin et moyens de lutte. Revue Française d'Enologie, **138**: 21 - 24.

Chatonnet, P., Debordieu, D., Boidron, J. N., 1995. The influence of Brettanomyces/Dekkera spp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. American Journal of Enology and Viticulture, **46**: 463 - 468

Ciani, M., Maccarelli, F. e Fatichenti F., 2003. Growth and fermentation behaviour of Brettanomyces/Dekkera yeasts under different conditions of aerobiosis. World Journal of Microbiology & Biotechnology, **19**: 419 - 422.

Coulon, J., Perello, M. C., Lonvaud-Funel, A., Revel, G. E Renouf, V., 2009. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatil phenols production in red wines during storage in bottles. *Journal of Applied Microbiology*, **108**: 1450 -1458.

Correia, P., 2004. Crescimento, viabilidade e produção de 4-etilfenol em mostos de uva e em vinhos por populações de *Pichia guilliermondii*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agrónómica. Universidade Técnica de Lisboa.

Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M. e Loureiro, V., 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, **20**: 377 - 384.

Du Toit, W. J., Pretorius, I. S. e Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, **98**: 862- 871.

Fleet, G. H., 1992. Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, **12**: 1-44.

Froudiere, I., Larue, F., 1988. Condition de survie de *Brettanomyces* (*Dekkera*) dans le moût de raisin et le vin. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **2**: 296 - 303.

Fugelsang, K. C., 1997. *Wine Microbiology*. The Chapman and Hall Enology Library, New York.

Fugelsang, K. C., Osborn, M. M. e Muller, C. J., 1993. *Brettanomyces* and *Dekkera*. Implications in winemaking in beer and wine production. *B. H. Gump*, **536**:110 - 129.

Gilliland, R. B., 1961. *Brettanomyces* I. Occurrence, characteristic and effects on beer flavour. *Journal of Institute of the Brewing*, **67**: 257 - 261.

Gonçalves, M. G.A., 1996. Leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*: Métodos de despiste rápido e sua incidência em vinho portugueses. Tese do Curso de Mestrado de Viticultura e Enologia. Universidade do Porto e Técnica de Lisboa.

Henschke, P., Curtin, C. e Girbin, P., 2007. Molecular characterization of the wine spoilage yeast – *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. Microbiology Australia, **28**: 76 - 78.

Joseph, C. M. L. e Bisson, L., 2004. Physiological diversity of Brettanomyces/Dekkera isolated from wine. Technical abstracts, 55th annual meeting. San Diego, CA (p. 28). Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture, **37**: 127 - 132.

Jensen, S. L., Umiker, N. L., Arneborg, N., Edwards, C. G., 2009. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. Food Microbiology, **26**: 915 - 921.

Kurtzman, C. P. e Fell, J. W., 1998. The yeasts. A taxonomic study. Fourth Revised and enlarge edition. Elsevier Science Publisher.

Larue, F., Rozes, N., Froudiere, I., Couty, C. e Pereira, G. P., (1991). Incidence du développement de Dekkera/Brettanomyces dans les mouts et les vins. Journal International des Sciences de La Vigne et fu Vin, **25**:149 - 165.

Loureiro, V., 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. Food Research International, **33**: 247 - 256.

Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeast in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, **86**: 23 - 50.

Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira, M. (2006). Spoilage activities of *Dekkera/Brettanomyces* spp. Blackburn, C. (ed.) *Food spoilage microorganisms*. Capitulo 13, pp. 354-398. Woodhead Publishers, Cambridge.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H. e Pretorius I. S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. American Society for Microbiology, **66**: 506 - 577.

Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N. e Loureiro, V., 2001. The influence of oxygen on the “horse sweat taint” in red wines. Italian Food & Beverage Technology, **24**: 34 - 38.

Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M. T., Loureiro, V., Querol, A., 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. International Journal of Food Microbiology, **106**: 79 - 84

Massini, L., Pereira-Lopes, F., Barnavon, L., Riou, C., Vuchot, P., (s/d). Etude physiologique de souches de *Brettanomyces* dans les vins de la vallée du Rhône. Retirado em 15 Junho, 2010, de www.institut-rhodanien.com/download/785.

Miniac, M., 1989. Contamination des fermentation alcooliques industrielles par les levures du genre *Brettanomyces*. Industries Alimentaires et Agricoles, **106**: 559 - 563.

Reguant, C., Bordons, A., Arola, L. e Rozes, N., 2000. Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. Journal Applied Microbiology, **88**: 1065 - 1071.

Renouf, V., Strehaiano, P. e Lonvaud-Funel, A., 2008. Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. Food Control, **19**: 208 - 216.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B. e Lonvaud, A. 2006. Handbook of enology *The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons, Ltd. Vol 1.

Rodrigues, N., 1998. Leveduras do género *Dekkera*: despiste rápido em vinhos e capacidade de produçao de 4-etilfenol. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro-Industrial. Universidade Técnica de Lisboa.

Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Sila, S., Malfeito-Ferreira, M. e Loureiro, V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Bruxellensis*. Journal of Applied Microbiology, **90**: 588 - 599.

Romano, A., Perello, M. C., Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008a. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. Journal Applied Microbiology, **104**: 1577 - 1585.

Silva, S., 1998. Leveduras do género *Dekkera*: incidência em vinhos portugueses e produção de etil- enol. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro-Industrial. Universidade Técnica de Lisboa.

Smith, M. T., Yamazaki, M. e Poot, G. A., 1990. *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Eeniella*: electrophoretic comparison of enzymes and DNA homology. *Yeasts*, **6**, 299-310.

Sponholz, W. R., 1992. Wine spoilage by microorganisms. In: wine microbiology and Biotechnology. Ed. G. H. Fleet, Harwood Academic Publishers. pp. 395 - 420.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, **102**:10 -21.

Terrell, R. R., Morris, J. R., Johnson, M. G., Gbur, E. E. e Makus, D. J., 1993. Yeast inhibition in grape juice containing sulphur dioxide, sórbico acid and dimethylcarbonate. *Journal of Food Science*, **58**: 1132 -1135.

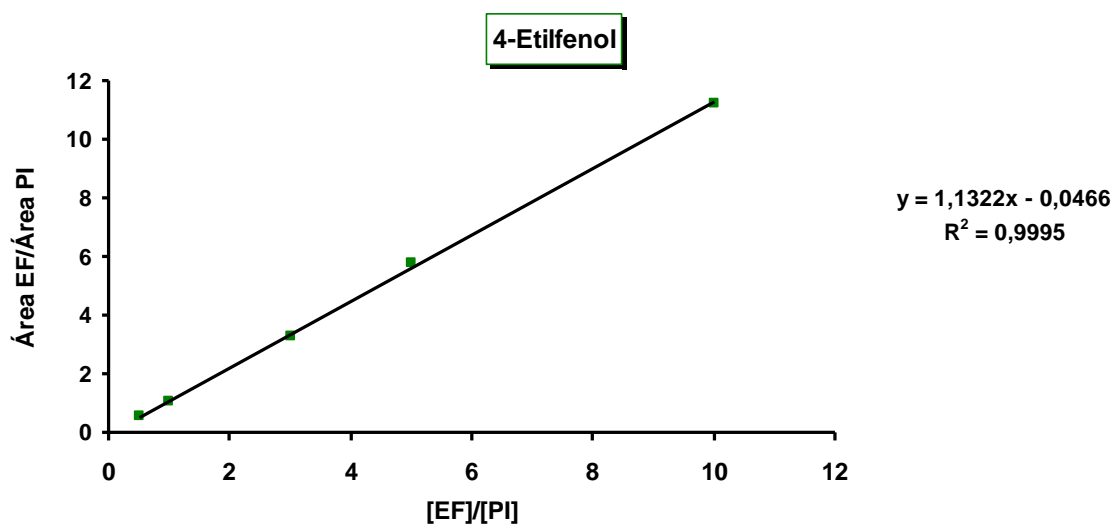
Thomas, D. S., 1983. Susceptibility of wines to yeast spoilage. Long Ashton Report, University of Bristol, UK.

Wedral, D., Shewfelt, R. e Frank, J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT-Food Science and Technology*. **43**: 1474 -1479.

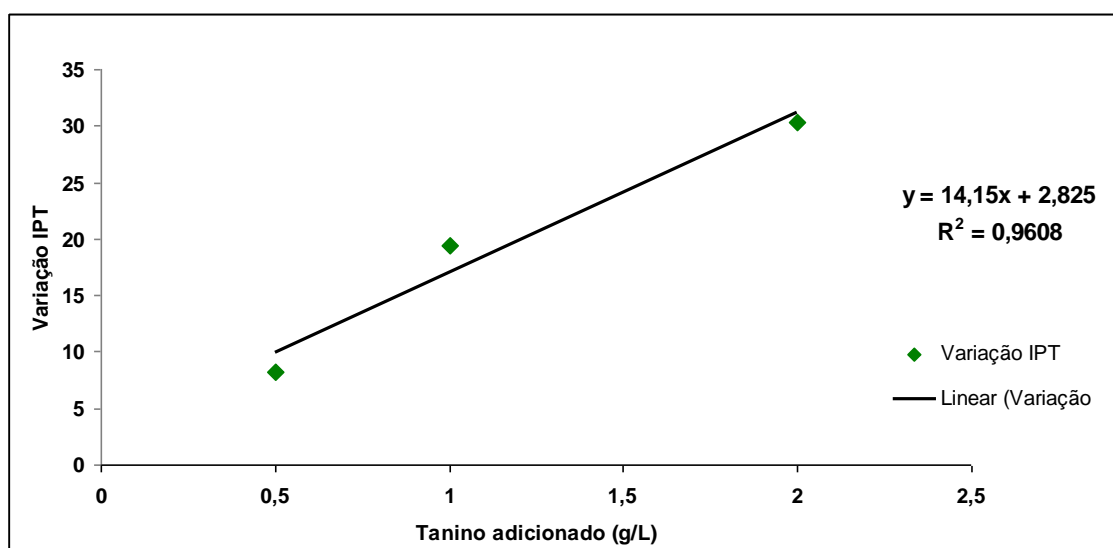
Wijsman MR, van Dijken JP, van Kleeff BH, Scheffers,WA (1984) Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custer effect). *Antonie van Leeuwenhoek*, **50**: 183 – 192.

Anexos

Anexo I – Curva de calibração para a determinação da concentração de 4-etilfenol por cromatografia gasosa.



Anexo II – Relação entre a quantidade de taninos adicionada e o índice de polifenóis totais (IPT)



Anexo III – Evolução das concentrações dos compostos: ácido tartárico, glucose, ácido galacturónico, frutose, ácido succínico, ácido láctico, glicerol, ácido acético e etanol por análise de HPLC

	Tempo (h)	Ácido Tartárico (g/l)	Glucose (g/l)	Ácido Galacturónico (g/l)	Frutose (g/l)	Ácido Succínico (g/l)	Ácido Láctico (g/l)	Glicerol (g/l)	Ácido Acético (g/l)	Etanol (g/l)
TN_A	0	3,68	2,62	2,30	0,00	1,33	3,07	12,94	0,64	10,30
	429	3,60	0,00	1,31	0,20	1,19	2,29	12,56	1,11	10,35
	1067	4,82	0,00	1,29	0,37	1,21	1,92	12,66	1,43	9,91
S_A	0	3,71	2,57	0,74	0,00	1,55	1,75	12,50	1,13	9,24
	429	3,90	0,00	1,35	0,00	1,59	2,91	12,48	1,04	10,11
	1067	4,00	0,00	1,07	0,00	1,19	1,03	10,75	2,65	8,21
S_R	0	3,91	0,00	0,61	2,08	1,33	3,26	12,66	1,29	9,40
	429	3,40	0,00	0,90	0,00	1,52	2,91	12,41	2,00	10,10
	1067	3,86	0,00	1,99	0,00	1,00	1,46	10,96	2,86	8,47
CS_A	0	4,05	2,24	0,00	0,79	1,30	1,91	11,87	0,61	9,48
	429	4,13	0,00	1,31	0,00	1,31	1,71	12,12	1,05	10,61
	1067	3,94	0,00	1,07	0,19	1,08	1,20	11,19	1,12	8,85
CS_R	0	3,57	0,00	1,75	4,97	1,70	5,10	14,44	0,71	10,03
	429	2,22	0,00	1,28	0,29	1,76	4,55	14,40	1,04	9,92
	1067	3,34	0,00	1,05	0,25	1,48	3,46	12,82	1,09	8,70
B	0	3,09	0,00	1,58	0,00	1,65	3,04	13,20	1,19	10,00
	429	2,47	0,00	1,49	0,00	1,55	2,78	12,91	1,15	9,81
	1067	3,40	0,00	1,45	0,00	1,33	2,11	11,76	1,30	8,26

Anexo IV – Curvas de calibração do HPLC para determinação das concentrações dos compostos: ácido tartárico, glucose, ácido galacturónico, frutose, arabinose, ácido succínico, ácido láctico, glicerol, ácido acético e etanol.

